



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

**ABORDAGEM FITOQUÍMICA, DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIPLASMÓDICA *IN VITRO* E AVALIAÇÃO PRELIMINAR DA
TOXICIDADE DO EXTRATO HIDROETANÓLICO DAS CASCAS
DE *Aspidosperma excelsum* Benth (APOCYNACEAE)**

Luis Fábio dos Santos Gomes

**BELÉM - PA
2011**

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

**ABORDAGEM FITOQUÍMICA, DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIPLASMÓDICA *IN VITRO* E AVALIAÇÃO PRELIMINAR DA
TOXICIDADE DO EXTRATO HIDROETANÓLICO DAS CASCAS DE
Aspidosperma excelsum Benth (APOCYNACEAE)**

Autor: Luis Fábio dos Santos Gomes

Orientador: Prof. Dr. Flávio de Vasconcelos

Co-Orientadora: Profa. Dra. Maria Fani Dolabela

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do
Pará para obtenção do título de Mestre em Ciências
Farmacêuticas

Área de concentração: Fármacos e Medicamentos

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

Biblioteca do Instituto de Ciências da Saúde – UFPA

Gomes, Luís Fábio dos Santos.

Abordagem Fitoquímica, determinação da atividade antiplasmódica *in vitro* e avaliação preliminar da toxicidade do extrato hidroetanólico das cascas de *Aspidosperma excelsum* Benth (apocynaceae) / Luís Fábio dos Santos Gomes ; orientador, Flávio de Vasconcelos, co-orientador, Maria Fani Dolabella. — 2011

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências da Saúde, Faculdade Farmácia, Belém, 2011.

1. *Aspidosperma excelsum* Benth. 2. Caranaúba. 3. Apocynaceae. 4. Malária. 5. Atividade Antiplasmódica. 6. Alcalóides. 7. Toxicidade. I. Título.

CDD 22.ed. :

615.321

FOLHA DE APROVAÇÃO

Luis Fábio dos Santos Gomes

“Abordagem fitoquímica, determinação da atividade antiplasmódica *in vitro* e avaliação preliminar da toxicidade do extrato hidroetanólico das cascas de *Aspidosperma excelsum* Benth (Apocynaceae) ”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do
Pará para obtenção do título de Mestre em Ciências
Farmacêuticas
Área de concentração: Fármacos e Medicamentos

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr.: Flávio de Vasconcelos

Instituição: Universidade Federal do Pará

Assinatura: _____

Prof. Dr.: José Luiz Fernandes Vieira Instituição:

Assinatura: _____

Prof. Dr.: Valdir Florêncio da Veiga Júnior

Instituição: Universidade Federal do Amazonas

Assinatura; _____

Dedico aos meus pais, Luís Antônio Bandeira e Maria José. A dedicação incondicional de vocês na minha educação foi fundamental, ter chegado até aqui não foi fácil, mas conseguimos. Dedico a minha avó (Daiza) em memória e ao meu pai de criação (Joaquim) os anos que passamos juntos foi essencial na minha vida.

A minha esposa Keylla, obrigado pela paciência e dedicação como mulher, amiga e mãe, você fez a diferença na minha vida.

Dedico especialmente a minha filha Anna Luisy, minha vida teve um novo sentido depois da sua chegada, você é maior incentivo pra tudo isso, papai te ama.

Luís Fábio dos Santos Gomes

AGRADECIMENTOS

Obrigado Deus Todo-Poderoso pelo dom da vida e da sabedoria. Obrigado por permitir que nos mortais por meio da ciência, possamos desvendar os mistérios da natureza que o Senhor criou.

Meus pais, Luís Antônio Bandeira e Maria José, as dificuldades que passamos mais uma vez foram vencidas. A minha avó (Daiza) em memória, pela dedicação de anos na minha criação, anos esses que lembro com muita nostalgia, mas que não voltam mais. E ao meu pai de criação (Joaquim) pela sua imensa dedicação também na minha educação.

A minha irmã (Flávia) e a meu irmãozinho (Marco Aurélio) e minhas sobrinhas Maria Beatriz e Bianca. A todos os momentos de alegria compartilhados durante todos esses anos.

Minha esposa (Keylla), só tenho que agradecer enormemente por todos esses anos de dedicação ao meu lado, e por ser a mãe da jóia mais preciosa que Deus nos concedeu, nossa filha Anna Luisy.

Agradeço aos contribuintes desse imenso país. Aqueles que levantam cedo todos os dias para ir trabalhar, a todos os Josés e a todas as Marias, foi por causa de vocês que consegui fazer a minha graduação e meu mestrado em uma universidade pública.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Flávio de Vasconcelos, pela sua dedicação em me orientar, pelos ensinamentos. Fico muito feliz em ser o seu primeiro orientando de pós-graduação, é algo que nunca esquecerei.

A Dra. Marinete Póvoa do Laboratório de Malária do Instituto Evandro Chagas, pela autorização na utilização do Laboratório para o cultivo das cepas de *P. falciparum*.

Ao Instituto Evandro Chagas pela doação dos animais utilizados neste trabalho.

Ao Prof. Wagner Barbosa que fez parte desse projeto. Agradeço pelas orientações e pelos resultados obtidos no Laboratório de Fitoquímica da Faculdade de Farmácia da UFPA.

Ao Prof. Dr. Washington Luiz Assunção Pereira, pela sua contribuição na análise histopatológica.

Ao Prof. Dr. José Luiz Vieira, pela contribuição científica neste trabalho e pela amizade.

A Universidade Federal do Pará, que foi meu segundo lar nestes últimos oito anos.

Aos amigos do Laboratório de Toxicologia da Faculdade de Farmácia, Priscilla e Amanda pelos momentos de alegria no laboratório. Ao Thiago Vilhena, Thiago Leite e Caroline pelo enorme ajuda no experimento de toxicidade aguda.

A amiga de mestrado Eliane Moraes, por ter realizado os experimentos de citotoxicidade no Laboratório de Fotoquimioproteção e Controle da Qualidade da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP de Ribeirão Preto. Um agradecimento muito especial a Eliane que foi mais do que uma colega de mestrado.

Aos meus amigos do mestrado. Bruno (futuro papai), Andressa Santa Brígida (mana), Heitor (do Bongô), Anivaldo Júnior, Eliane, Taís Gabbay, Josy, Cléia, Alex Oselu, Sarah Scarlécio, Taysa (Tica), Jeane. Um imenso agradecimento a todos vocês por todos os momentos de alegrias que passamos juntos, a amizade de vocês foi fator essencial nesse mestrado que foi apenas dois anos, mas a amizade será para sempre.

A Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Ao Prof. Dr. José Otávio Carrerá coordenador do PPGCF pelos conselhos e pela amizade. A Cliciane secretária do PPGCF, sempre disposta ao trabalho e resolvendo os problemas, e também a dona Brasília, vou sentir falta daqueles cafés dela que reunia toda a turma naqueles fins de tarde.

Aos amigos do mestrado da turma de 2010. Michel (Restart), Dayse, Thaís Andrade, Ademar Melo e Fabrício Alexopulos amigo desde os bons tempos de graduação.

“Quanto mais me elevo, menor fico aos olhos de quem não sabe voar.”

(Friedrich Wilhelm Nietzsche)

RESUMO

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

A malária é uma doença causada por protozoários do gênero *Plasmodium*. O tratamento da malária está se tornando cada vez mais difícil com a expansão dos casos de parasitas resistentes aos fármacos utilizados na terapêutica. Neste contexto, produtos isolados a partir de plantas têm dado importante contribuição, representando importante fonte para a obtenção de novos fármacos antimaláricos. A atividade antiplasmódica de alcalóides de origem vegetal tem sido amplamente relatada na literatura. Plantas da família Apocynaceae, ricas em alcalóides indólicos, apresentam amplas propriedades medicinais e algumas espécies do gênero *Aspidosperma* já demonstraram potencial antimalárico. Assim, este trabalho teve como objetivo realizar uma abordagem fitoquímica, avaliar a atividade antiplasmódica *in vitro* e a toxicidade preliminar do extrato hidroetanólico concentrado das cascas de *A. excelsum*, nativa da Região Amazônica, onde é usada tradicionalmente para tratar várias enfermidades, inclusive malária. A atividade antiplasmódica *in vitro* de diferentes concentrações do extrato e frações alcaloídica e metanólica foi avaliada em culturas de *P. falciparum* W2 pela percentagem de inibição da parasitemia e determinação da concentração inibitória média (CI₅₀) em intervalos de 24, 48 e 72 h. O ensaio de citotoxicidade do extrato e fração alcaloídica foi realizado em fibroblastos L929 de camundongo pelo método do MTT e o teste de toxicidade aguda oral do extrato foi realizado de acordo com o Procedimento de Dose Fixa adotado pela OECD com pequenas adaptações. A prospecção fitoquímica revelou a presença de saponinas, açúcares redutores, fenóis e taninos e alcalóides e estes foram confirmados em quantidades significativas na fração alcaloídica extraída com clorofórmio (C2). Através de cromatografia em camada delgada e cromatografia líquida de alta eficiência do extrato, foi caracterizada a presença do alcalóide indólico ioimbina. O extrato e as frações apresentaram atividade antiplasmódica *in vitro*. O extrato apresentou a melhor atividade em 24 h (CI₅₀= 5,2 ± 4,1 µg/mL), indicando uma boa atividade esquizonticida. Apenas a fração alcaloídica C2 apresentou uma pequena, porém significativa citotoxicidade (concentrações superiores a 800 µg/mL). O extrato não só não apresentou citotoxicidade como também nenhum sinal evidente de toxicidade aguda oral na dose de 5000 mg/mL. Os resultados obtidos indicam que o extrato de *Aspidosperma excelsum* Benth apresenta promissor potencial antimalárico, merecendo estudos mais detalhados sobre sua atividade antiplasmódica, com vistas no isolamento de compostos ativos e elucidação de seu(s) mecanismo(s) de ação.

Palavras-chave: *Aspidosperma excelsum*, Carapanaúba, Apocynaceae, Malária, Atividade Antiplasmódica, Alcalóides, Toxicidade.

ABSTRACT

GOMES, L.F.S. “**Phytochemical approach, *in vitro* antiplasmodial evaluation and preliminar assessment of the toxicity of *Aspidosperma excelsum* Benth bark hydroethanolic extract (Apocynaceae)**”. 2011. 98 p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará.

Malaria is a disease caused by protozoa of the genus *Plasmodium*. The treatment of malaria is becoming increasingly difficult with the expansion of the cases of parasites resistant to drugs used in therapy. In this context, products isolated from plants have give an important contribution, representing an important source for obtaining new antimalarial drugs. Antiplasmodial activity of alkaloids of plant origin has been widely reported in the literature. Plants of the Apocynaceae family, rich in indole alkaloids have medicinal properties and some large species of the genus *Aspidosperma* have demonstrated antimalarial potential. Thus, this study aimed to perform a phytochemical approach, evaluate the antiplasmodial activity and toxicity *in vitro* preliminary of the hydroethanolic extract from the bark of *A. excelsum*, native of the Amazon region, where it is traditionally used to treat various diseases, including malaria. Antiplasmodial activity *in vitro* of different concentrations of the extract and alkaloidal and methanolic fractions was evaluated in cultures of *P. falciparum* W2 by the percentage of inhibition of parasitaemia and the mean inhibitory concentration (IC₅₀) was determined at intervals of 24, 48 and 72 h. The cytotoxicity assay of the extract and alkaloidal fraction was carried out on L929 mouse fibroblasts by MTT method and the testing of acute oral toxicity of the extract was carried out according to the Fixed Dose Procedure adopted by the OECD with small modifications. The phytochemical approach revealed the presence of saponins, reducing sugars, phenols and tannins and alkaloids, and these were confirmed in significant amounts in the alkaloidal fraction with chloroform fraction (C2). Through thin layer chromatography and high performance liquid chromatography of the extract characterized the presence of the indole alkaloid yohimbine. The extract and fractions showed antiplasmodial activity *in vitro*. The extract showed the best activity in 24 h (IC₅₀ = 5.2 ± 4.1 µg / mL), indicating a good activity schizonticide. Only C2 alkaloidal fraction showed a small but significant cytotoxicity (concentrations higher than 800 µg/mL). The extract not only cytotoxicity but also did not showed any obvious sign of toxicity in acute oral dose of 5000 mg/mL. The results indicate that the extract of *Aspidosperma excelsum* Benth presents promising potential antimalarial and deserves more detailed studies on antiplasmodial activity, aiming the isolation of active compounds and elucidation of their mechanisms of action.

Keywords: *Aspidosperma excelsum*, Carapanauba, Apocynaceae, Malarie, Antiplasmodial Activity, Alkaloids, Toxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01	Ciclo biológico do parasita da malária	20
Figura 02	<i>Aspidosperma excelsum</i> Benth: A) Exsicata; B) Folhas e inflorescência; C) fruto	34
Figura 03	<i>Aspidosperma excelsum</i> , espécime do qual foram retiradas amostras de cascas do tronco para a realização do estudo.	44
Figura 04	Mapa de localização do ponto de coleta das cascas de <i>A. excelsum</i> Benth.	45
Figura 05	Esquema da obtenção do EHEAe	47
Figura 06	Obtenção das frações a partir do EHEAe com solventes de polaridade crescente	48
Figura 07	Obtenção das Frações Alcalóidicas.	50
Figura 08	Cromatografia em camada delgada (CCD) do EHEAe e frações. (A) Cromatograma observado em $\lambda = 254\text{nm}$. (B) Cromatograma observado em $\lambda = 365\text{nm}$. (C) Cromatograma revelado com Reativo de Dragendorff	66
Figura 09	A) Cromatograma da amostra retirada da cromatografia preparativa do EHEAe (B) Cromatograma do padrão de ioimbina P.A.	68
Figura 10	Espectro de UV da amostra proveniente da CCD preparativa e do padrão de ioimbina P.A.	69
Figura 11	Efeitos de diferentes concentrações do EHEAe liofilizado sobre a viabilidade de células de fibroblastos L929 de camundongos.	73
Figura 12	Efeitos de diferentes concentrações da fração alcalóidica (C2) do EHEAe sobre a viabilidade de células de fibroblastos L929 de camundongos.	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 01	Frações obtidas a partir do tratamento do EHEAe (2,0 g) com solventes de polaridade crescente.	62
Tabela 02	Rendimento das frações alcaloídicas obtidas a partir do pó das cascas de <i>A. excelsum</i> e EHEAe/ EHEAe em sol. aquosa	63
Tabela 03	Resultados da prospecção fitoquímica do EHEAe para diferentes classes de metabólitos secundários	64
Tabela 04	Concentração Inibitória média (CI ₅₀) do EHEAe e frações alcaloídica (C2) e metanólica	71
Tabela 05	Avaliação da atividade antiplasmódica de acordo com a CI ₅₀	72
Tabela 06	Variação da evolução ponderal de camundongos (machos e fêmeas) tratados com dose única de 5000 mg/kg de EHEAe liofilizado e observados durante 14 dias.	77
Tabela 07	Consumo de ração e água pelos camundongos (machos e fêmeas) tratados com dose única de 5000 mg/kg de EHEAe liofilizado e observados durante 14 dias.	76

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CI₅₀	Concentração Inibitória Média
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CoBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DL₅₀	Dose Letal Mediana
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EHEAe	Extrato hidroetanólico concentrado das cascas <i>Aspidosperma excelsum</i>
FCFRP	Faculdade Ciências Farmacêuticas Ribeirão Preto
I.P.	Intraperitoneal
ICAM-1	Molécula de Adesão
ICCVAM	Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods
LDH	Lactato Desidrogenase
MTT	brometo de 3 - (4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5 difeniltetrazolio
OECD	Organization for Economic Co-operation and Development
PfEMP1	Proteína 1 de Membrana do Eritrócito do <i>P. falciparum</i>
pH	Potencial Hidrogeniônico
RP	Reverse Phase
SDS	Duodecil Sulfato de Sódio
SFB	Soro Fetal Bovino
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral alfa
UFPA	Universidade Federal do Pará
UFRA	Universidade Federal Rural do Amazônia
UI	Unidades Internacionais
USP	Universidade de São Paulo

LISTA DE SIMBÓLOS E UNIDADES

%	Percentual
λ	Lâmbda (comprimento de onda)
μg	Micrograma
$^{\circ}\text{C}$	Grau Celsius
CO_2	Dióxido de Carbono
Fe^{2+}	Cátion Ferroso
Fe^{3+}	Cátion Férrico
g	Gramas
H_2O	Água
HCl	Ácido Cloródrico
L	Litro
M	Molar
m/v	Massa/volume
mg	Miligrama
Min.	Minutos
mL	Mililitro
NH_4OH	Hidróxido de Amônio
nm	Nanômetro
μM	Micromolar

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 MALÁRIA	17
1.2 O USO DE PLANTAS MEDICINAIS NA TERAPIA DA MALÁRIA	22
1.3 FAMÍLIA APOCYNACEAE	24
1.4 GÊNERO <i>ASPIDOSPERMA</i>	26
1.5 <i>ASPIDOSPERMA EXCELSUM</i>	33
1.6 ENSAIOS <i>IN VITRO</i> PARA ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIPLASMÓDICA	35
1.7 CONSIDERAÇÕES A RESPEITO DA AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE PLANTAS MEDICINAIS E DROGAS VEGETAIS	37
2. OBJETIVOS	42
2.1 OBJETIVO GERAL	42
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
3. MATERIAL E MÉTODOS	43
3.1 CONDIÇÕES DE COLETA E OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL	43
3.2 IDENTIFICAÇÃO	43
3.3 PREPARAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL	46
3.4 PREPARAÇÃO DO EXTRATO HIDROETANÓLICO A 70% V/V DO PÓ DAS CASCAS DO TRONCO DE <i>A. excelsum</i>	46
3.5 OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES (HEXÂNICA, CLOROFÓRMICA, ACETATO DE ETILA E METANÓLICA) E EXTRAÇÃO ÁCIDO-BASE (FRAÇÕES ALCALOÍDICAS)	47
3.6 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA DO EXTRATO	51
3.7 OBTENÇÃO DO PERFIL CROMATOGRÁFICO EM CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD) E EM CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) DO EHEAE E FRAÇÕES ALCALOÍDICAS	53
3.8 ATIVIDADE ANTIPLASMÓDICA <i>IN VITRO</i> PELO MICROTESTE EM CULTURAS DE <i>Plasmodium falciparum</i> .	54

3.8.1 DISSOLUÇÃO DAS AMOSTRAS PARA A REALIZAÇÃO DOS ENSAIOS <i>IN VITRO</i>	54
3.8.2 CULTIVO DOS ISOLADOS RESISTENTE E SENSÍVEL DO <i>Plasmodium falciparum</i>	54
3.8.3 MICROTESTE TRADICIONAL	55
3.9 AVALIAÇÃO PRELIMINAR DA TOXICIDADE	56
3.9.1 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE	56
3.9.1.1 Linhagem celular e cultivo	56
3.9.1.2 Avaliação da citotoxicidade do EHEAe liofilizado e da fração alcaloídica pelo ensaio do MTT	57
3.9.2 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE ORAL AGUDA	58
3.9.2.1 Animais e condições de acomodação	58
3.9.2.2 Teste de toxicidade aguda	59
3.9.2.2.1 Avaliação da Evolução Ponderal e Consumo de Água e Alimento	60
3.9.2.2.2 Avaliação anátomo e histopatológica	60
3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA	61
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	62
4.1 RENDIMENTO DO EXTRATO HIDROETANÓLICO DAS CASCAS DE <i>A. EXCELSUM</i> E FRAÇÕES	62
4.2 RENDIMENTO DAS FRAÇÕES ALCALOÍDICAS	62
4.3 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA DO EXTRATO HIDROETANÓLICO DAS CASCAS DE <i>A. EXCELSUM</i>	63
4.4 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DO EXTRATO HIDROETANÓLICO DAS CASCAS DE <i>A. EXCELSUM</i> E SUAS FRAÇÕES	65
4.5 ATIVIDADE ANTIPLASMÓDICA DO EXTRATO, FRAÇÃO ALCALOÍDICA (C2) E FRAÇÃO METANÓLICA	71
4.6 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE DO EHEAe E DE SUA FRAÇÃO ALCALOÍDICA (C2)	73
4.7 TOXICIDADE AGUDA ORAL	76
5. CONCLUSÕES	80
6. REFERÊNCIAS	81
7. ANEXOS	99

1. INTRODUÇÃO

1.1 MALÁRIA

A malária, também conhecida como paludismo, maleita ou sezão, foi primeiramente citada por Hipócrates, durante a era pré-cristã, o qual as descreveu suas características de ocorrência sazonal e de febre com padrão paroxístico e intermitente. É uma doença infecciosa febril aguda, cujos agentes etiológicos são protozoários transmitidos por vetores. Atualmente, reveste-se de importância epidemiológica pela sua elevada incidência no mundo e potencial gravidade clínica, causando consideráveis perdas sociais e econômicas na população sob risco, principalmente aquela que vive em condições precárias de habitação e saneamento (BRAGA, 2005).

A malária permanece como uma das mais doenças infecciosas mais prevalentes no Mundo. Em 2006, houve aproximadamente 247 milhões de casos de malária e 3,3 bilhões de pessoas estiveram em risco de contrair a doença. Aproximadamente 1 milhão de mortes, principalmente de crianças abaixo de 5 anos, foram causadas por malária (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009). Na África, uma em cada quatro crianças morrem devido à doença e estima-se que a cada três segundos, uma morra de malária. Ainda, a enfermidade é a causa da morte de mais de 10 mil grávidas e por volta de 200 mil infantes no continente.

Nas Américas, a transmissão de malária ocorre em 21 países, sendo o *P. vivax* responsável por 77% do total dos casos. No entanto, em países como Haiti e República Dominicana o *P. falciparum* ainda domina as estatísticas com 100% dos casos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009).

No Brasil, mesmo com a redução no número de notificações nos últimos anos, a doença ainda apresenta elevado risco de incidência e transmissão na Amazônia Legal Brasileira, sendo esta considerada a região endêmica do país. De acordo com o Ministério da Saúde, a região Amazônica concentra 99,7% dos casos de malária do país e abrange os estados do Amazonas, Amapá, Acre, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins, além de Mato Grosso e Maranhão. A maioria dos casos ocorre em áreas rurais, mas há registro da doença também em áreas urbanas em cerca de 15% (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009).

A doença é causada por protozoários do gênero *Plasmodium* e transmitida pelas fêmeas dos mosquitos do gênero *Anopheles*, durante o repasto sanguíneo. Além disso,

a malária pode ser transmitida de forma induzida, através de transfusão sanguínea com sangue contaminado, ou com utilização de seringas com agulhas contaminadas. Existem cerca de 150 espécies de parasitas causadoras desta enfermidade em diferentes hospedeiros vertebrados, sendo quatro delas capazes de transmitir a doença em humanos: *Plasmodium vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* (este ocorre apenas em regiões restritas do continente africano) e *P. falciparum*, sendo este último capaz de desencadear as formas graves da doença (BRAGA, 2005; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009). O *Plasmodium knowlesi*, causador de malária em macacos no sudeste asiático, foi recentemente reconhecido como causador de um tipo específico de malária para humanos. Pesquisadores da Malásia estudaram a apresentação clínica deste parasita para definição de sua evolução nos homens (WHITE, 2008; DANESHVAR et al. 2009).

O início da infecção ocorre quando esporozoítos infectantes são inoculados nos seres humanos pelo mosquito durante o repasto sanguíneo. Uma vez alcançada a corrente sanguínea, os esporozoítos migram pelo corpo até atingirem os hepatócitos, onde se processa o desenvolvimento parasitário, cerca de 30 minutos após a infecção. Após a invasão dos hepatócitos, os esporozoítos se diferenciam em trofozoítos pré-eritrocíticos, que multiplicam-se assexuadamente por esquizogonia, dando origem aos esquizontes teciduais e, posteriormente milhares de merozoítos que invadirão os eritrócitos. Esta primeira fase do ciclo é denominada exo-eritrocítica, pré-eritrocítica ou tissular e, portanto, precede o ciclo sanguíneo do parasita (BRAGA, 2005).

O desenvolvimento nas células do fígado requer em torno de uma semana para *P. falciparum* e *P. vivax* e cerca de duas semanas para *P. malariae*. Nas infecções causadas por *P. vivax* e *P. ovale*, o mosquito vetor inocula populações de esporozoítos geneticamente diferentes: algumas se desenvolvem rapidamente, causando as manifestações normais da doença, enquanto outras ficam em estado de latência nos hepatócitos, sendo estas chamadas de hipnozoítos. Essas formas são responsáveis pelas recaídas tardias da doença, que podem ocorrer em períodos variáveis de incubação, em geral cerca de seis meses para a maioria das cepas de *P. vivax* (BRAGA, 2005).

Com a invasão dos merozoítos nos eritrócitos, inicia-se o ciclo eritrocítico. O *P. vivax* invade apenas reticulócitos, enquanto o *P. falciparum* invade hemácias de todas as idades. O *P. malariae* tende a invadir hemácias maduras. O desenvolvimento intra-eritrocítico do parasita ocorre por esquizogonia, semelhante a que ocorre nos

hepatócitos, com conseqüente formação de novos merozoítos que invadiram novos eritrócitos. É importante ressaltar que é no momento da lise dos eritrócitos, com a liberação dos merozoítos e dos restos celulares, que surgem os sintomas típicos da malária: mal-estar, cefaléia, cansaço, mialgia, as quais geralmente precedem a febre. O acesso malárico (ataque paroxístico agudo) que coincide com a ruptura das hemácias, é geralmente acompanhada de calafrio e sudorese, que dura de 15 minutos a uma hora, sendo seguida por uma fase febril, com a temperatura corpórea chegando a 41°C, que dura de duas a seis horas, ocorrendo após este período sudorese e fraqueza intensas, que tendem a desaparecer após algumas horas (BRAGA, 2005).

Após a formação de algumas gerações de merozoítos sanguíneos, ocorre a diferenciação em estágios sexuais, os gametócitos, que não sofrerão divisão e seguirão seu desenvolvimento no mosquito vetor, dando origem aos esporozoítos. O ciclo sanguíneo se repete sucessivas vezes: a cada 48 horas, nas infecções por *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. ovale* e a cada 72 horas, nas infecções por *P. malariae*. Particularmente, durante a esquizogonia sanguínea do *P. falciparum*, ocorre uma série de modificações na superfície do eritrócito parasitado, que permitem a adesão deste à parede endotelial dos capilares. Este fenômeno é mediado pela proteína 1 de membrana do eritrócito do *P. falciparum* (PfEMP1), expressa na superfície das hemácias infectadas, formando protuberâncias ou *knobs* (BERENDT et al. 1990).

Várias moléculas do hospedeiro participam deste processo, sendo o antígeno de adesão leucocitária (CD36), a molécula de adesão intercelular (ICAM-1), e o sulfato de condroitina as mais importantes. ICAM-1 parece ser o principal ligante no cérebro, CSA, na placenta e CD36, na microcirculação de diferentes órgãos. O fator de necrose tumoral α , (TNF- α) e outras citocinas, aparentemente, podem estimular a expressão de moléculas de adesão, principalmente ICAM-1, nos capilares cerebrais. Este fenômeno tende a ocorrer principalmente nas vênulas do novelo capilar de órgãos vitais (substância branca do cérebro e coração, por exemplo) e dependendo da intensidade, podem levar à obstrução da microcirculação e conseqüente redução do fluxo de oxigênio, ao metabolismo anaeróbico e à acidose láctica. O cérebro, os rins e o fígado são alvos dessa agressão, cujos danos acredita-se serem responsáveis, pelo menos em parte, pelas complicações da malária cerebral, insuficiência renal aguda e hepatite, tão comuns nos quadros de malária grave (BERENDT et al. 1994; BRAGA, 2005).

Durante o repasto sanguíneo, a fêmea do mosquito ingere as formas sanguíneas do parasita, mas somente os gametócitos serão capazes de continuar a evolução no

inseto. No intestino médio do mosquito, fatores como a temperatura e aumento pH estimulam o processo de gametogênese, no qual os gametócitos se transformam em gametas extracelulares em poucos minutos após a ingestão do sangue. O gametócito feminino torna-se o macrogameta e o gametócito masculino, por um processo denominado exflagelação, dá origem a oito microgametas. Em torno de 30 minutos, um macrogameta será fecundado por um microgameta, formando um ovo, ou zigoto e após 24 horas esse zigoto passa a movimentar-se por contrações do corpo, sendo denominado oocineto. Ao atingir a parede do intestino médio, este se encista na camada epitelial do órgão, passando a se chamar oocisto. Tem início, então o processo de divisão esporogônica e, após um período que varia de 9 a 14 dias, ocorre a ruptura da parede do oocisto, liberando os esporozoítos formados durante o processo de esporogonia. Estes serão então disseminados pelo corpo do vetor até que atinjam as glândulas salivares. Com o repasto sanguíneo, estes esporozoítos serão injetados no hospedeiro vertebrado, reiniciando ciclo biológico (BRAGA, 2005) (Figura 1).

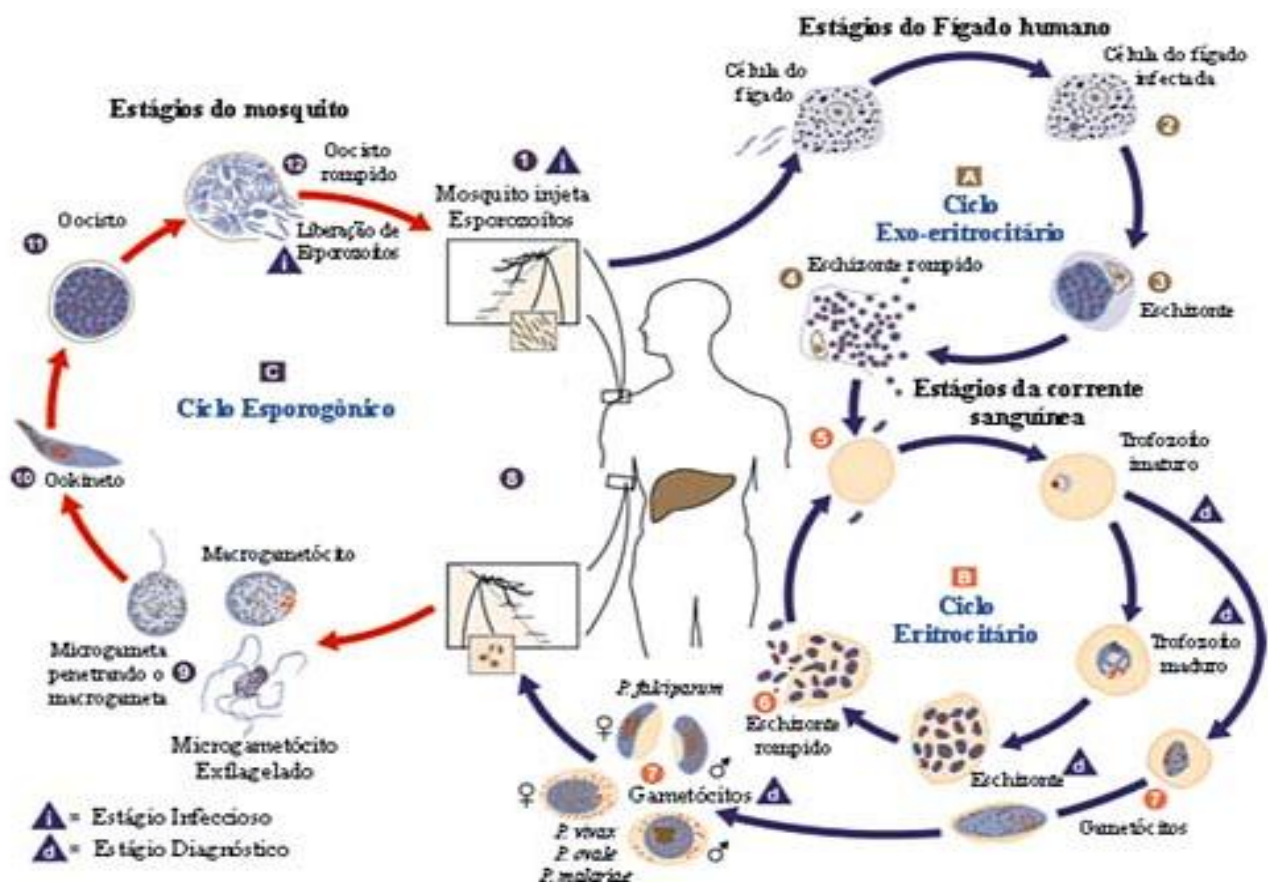


Figura 1 : Ciclo biológico do parasita da malária. Fonte: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx> adaptado por França et al. 2008.

Além dos sintomas clássicos descritos acima, a malária comumente acarreta o desenvolvimento de anemia, que apesar de freqüente, apresenta-se em graus variáveis, sendo mais intensa nas infecções por *P. falciparum*. Em áreas endêmicas, podem surgir manifestações crônicas, como a síndrome da esplenomegalia aguda, que consiste nos seguintes sintomas: esplenomegalia, hepatomegalia, anemia, leucopenia e plaquetopenia. Ainda podem ocorrer proteinúria, hipoalbuminemia e edema em casos de malárias não-tratadas causada por *P. malariae*. (BRAGA, 2005).

No caso da infecção causada pelo *P. falciparum*, pode ocorrer manifestações mais graves da doença, que podem chegar a ser fatais. Sintomas como convulsões, vômitos repetidos, hiperpirexia, icterícia e distúrbio da consciência, são indicadores desta situação e podem preceder o quadro grave. Dentre as diversas manifestações graves da malária, podemos destacar a malária cerebral. Esta consiste de um quadro de forte cefaléia, hipertermia, vômitos e sonolência, além de convulsões em crianças. Este quadro tende a evoluir para o coma (BRAGA, 2005).

O tratamento e o controle da malária tornaram-se mais difíceis com a crescente expansão dos casos de parasitas resistentes aos fármacos amplamente utilizados (CASTEEL, 1997) e de vetores resistentes aos inseticidas usuais (WHO, 2010).

A toxicidade dos fármacos utilizados na terapêutica também limita os seus usos. Por estas razões, é premente a necessidade de busca de novas e mais eficazes alternativas terapêuticas para combater as cepas de *P. falciparum* resistentes, promovendo a cura em tempo razoável (3 dias) para garantir adesão ao tratamento, sejam seguros e de baixo custo (FIDOCK et al. 2004).

Neste contexto, as plantas têm dado importante contribuição e produtos isolados a partir do extrato destas fontes naturais continuam a representar uma importante fonte para a obtenção de protótipos candidatos a novos fármacos antimaláricos (BIOT e CHIBALE, 2006).

A atividade antiplasmódica de alcalóides de origem vegetal tem sido amplamente relatada na literatura, sendo que no período de 1990 a 2000 mais de uma centena de substâncias ativas desta classe foram descritas, algumas até mais potentes que a cloroquina (SAXENA et al., 2003).

1.2 O USO DE PLANTAS MEDICINAIS NA TERAPIA DA MALÁRIA

A investigação de plantas utilizadas na medicina tradicional no tratamento de diversas enfermidades, bem como a identificação e isolamento dos principais componentes químicos, tem se tornado no foco mais importante na busca de novas substâncias farmacologicamente ativas.

Drogas vegetais têm sido utilizadas não somente como agentes terapêuticos, mas também para a caça e para a guerra (BISSET, 1989), bem como para rituais religiosos (SCHULTES et al. 1989), abortivo e procedimentos judiciais (KUTALEK et al. 2005).

Dentre os principais objetivos do estudo de plantas medicinais estão:

- Isolamento de seus compostos, para uso como fármaco, enquanto não houver via de síntese viável (ex: vimblastina).
- Produção de compostos bioativos de estruturas novas ou conhecidas, onde o composto vegetal funciona como protótipo para síntese/semi-síntese e para produção de estruturas de maior atividade e/ou menor toxicidade.
- Utilização desses agentes como ferramentas farmacológicas (ex: (-)-tubocurarina).
- Utilização de parte ou da totalidade da planta como fitomedicamento.

Estima-se que 65% da população mundial utiliza-se de plantas medicinais, sendo a fonte principal de terapia devido à dificuldade de acesso a outras formas de tratamento (FARNSWORTH et al. 1985). Além disso, foi relatado que só se conhece entre 5 e 15% da composição química de 250.000 a 750.000 espécies de plantas superiores desse planeta e que nada se conhece sobre a composição de mais de 99% da flora brasileira (BALANDRIN et al. 1985), situação esta agravada pela perda contínua de espécies vegetais devido à intensa ocupação humana e destruição dos ecossistemas. Isso representa perda não só de diversidade química, bem como de mecanismos de ação únicos que podem nunca ser estudados (JOHNSTON, 1998).

As drogas vegetais e as plantas medicinais são importantes fontes de agentes terapêuticos promissores para doenças infecciosas, distúrbios lipídicos e imunomodulação (ALTMANN, 2001).

O tratamento para malária humana visa, principalmente, interromper a esquizogonia sanguínea, que é a causa da patogênese e dos sintomas clínicos da doença. O tratamento oral previne a progressão da doença para estados severos, ou

seja, se os fármacos forem administradas corretamente, ocorre a diminuição da morbidade e mortalidade causada pela doença. (OLIVEIRA et al. 2009).

Para que uma substancia de origem vegetal de fato se torne uma droga antimalárica, sugere-se que se sigam alguns critérios de seleção para as substâncias candidatas (WRIGHT, 2010):

- As substâncias devem apresentar atividade antiplasmódica potente, tanto em cepas de *P.falciparum* resistentes, como as não resistentes à cloroquina;
- Devem ser seletivamente tóxicas aos parasitas da malária;
- Devem erradicar parasitas da malária em camundongos, sem apresentar toxicidade;
- Devem ser ativos quando utilizados por via oral.

O primeiro fármaco antimalárico foi a quinina, uma substancia isolada pela primeira vez em 1820 da casca de *Chinchona spp.* A estrutura da quinina foi estabelecida por vez por Rabe em 1908, e sua síntese foi concluída em 1944 por Wooward e Doering, porém, sua produção em escala industrial mostrou ser muito onerosa, o que restringiu seu uso. A quinina é atualmente isolada de árvores *Chinchona spp.* que crescem na América do Sul (OLIVEIRA et al. 2009).

A Cloroquina foi sintetizada a partir da quinina e, até pouco tempo atrás, uma das únicas drogas disponíveis para o combate à malária. Porém, nos últimos trinta anos, a situação ficou pior com a multiplicação das cepas de *Plasmodium falciparum* resistentes à cloroquina, o que causou o aumento na mortalidade, principalmente nos países do continente africano (OLIVEIRA et al. 2009).

Apesar dos esforços para a produção de novos fármacos antimaláricos sintéticas, a contribuição mais relevante que ocorreu recentemente foram as pesquisas com plantas medicinais que contêm artemisinina. Esta substância foi isolada em 1972 da *Artemia annua*, uma espécie de uso tradicional da China. Os derivados semi-sintéticos desse composto vêm sendo usados de maneira crescente. Embora eles sejam efetivos contra *P. falciparum resistentes à cloroquina*, o tratamento combinado com outra droga é recomendado, a fim de se evitar o desenvolvimento de resistência (OLIVEIRA et al. 2009). Infelizmente, já existem indícios de cepas resistentes ao tratamento baseado na terapia com artemisinina e derivados no oeste do Camboja (WHITE, 2008).

Embora muitos extratos de plantas com atividade antiplasmódica tenham sido reportados na literatura recente (para revisão ver BATISTA et al. 2009), os resultados

muitas vezes mostram apenas modesta atividade *in vitro* contra os parasitas ou contra a malária experimental em camundongos, sugerindo que a espécie em questão provavelmente tem apenas um limitado efeito no homem e que a cura da doença é improvável.

No entanto, isso pode não significar necessariamente que medicamentos elaborados a partir destas espécies não tenham valor, já que os tratamentos podem ser benéficos nos casos em que o curso da doença é reduzido por, exemplo, pela redução da anemia e outras complicações decorrentes desta anemia, até mesmo o risco de morte. Além disso, os benefícios podem incluir o alívio dos sintomas, como dor, febre e imunomodulação, levando a um aumento da imunidade (WRIGHT, 2005).

Finalmente, é importante ressaltar que os extratos de plantas também podem ser eficazes contra o parasita na fase hepática. Conforme comentado anteriormente, o desenvolvimento mais recente de derivados de artemisina reafirmou o potencial de diferentes espécies de plantas em fornecer medicamentos eficazes no tratamento da malária.

Dentre os inúmeros espécimes vegetais que são utilizados tradicionalmente na Região Amazônica, as espécies da família Apocynaceae destacam-se por suas diferentes propriedades medicinais (WENIGER et al. 2001; FERREIRA et al. 2004). As Apocynaceae também são ricas em alcalóides indólicos, uma classe química de variada atividade biológica nas quais certas substâncias já demonstraram potencial antimalárico (KAUR et al. 2009).

1.3 FAMÍLIA APOCYNACEAE

A família Apocynaceae possui cerca de 200 gêneros e 4000 espécies, de distribuição predominantemente tropical e subtropical, podendo raramente chegar até regiões temperadas. As espécies da família Apocynaceae ocorrem desde o nível do mar até às altas montanhas, principalmente em solos secos. As plantas que pertencem a esta família são de hábito variado, ervas, subarbustos, árvores, e trepadeiras, na maioria latescentes, que vivem tanto nos campos como nas matas e florestas. Tem folhas em geral opostas e verticiladas com estípulas rudimentares; flores pequenas e também grandes e vistosas, tipicamente pentâmeras, hermafroditas, diclamídeas; fruto

seco capsular ou indeiscente, ou então dois frutículos, secos, deiscentes (GRAEBNER, 2003).

Membros da família Apocynaceae constituem em uma importante fonte de descobertas farmacológicas, tendo sido usado por séculos para fins medicinais (GILANI et al. 2007). Como exemplos de compostos isolados desta família botânica, têm-se a vinblastina/vincristina (inibidores da polimerização das proteínas do fuso mitótico) e reserpina (inibidor da captação de noradrenalina) comumente usados na clínica (NEUSS, 1970).

Na família Apocynaceae algumas espécies do gênero *Aspidosperma* são utilizadas pelas populações indígenas e caboclas para vários fins medicinais, inclusive no tratamento da malária (MILLIKEN, 1997). As espécies mais utilizadas são *A. nitidum*, *A. auriculatum* (típicas da Região Amazônica), *A. marcgravianum*, *A. carapanauba* e *A. desmantun* (BRANDÃO et al. 1992; MILLIKEN, 1997).

As espécies do gênero *Aspidosperma* mais utilizadas contra malária e doenças febris na Amazônia, caracterizam-se quimicamente pela ocorrência freqüente de alcalóides indólicos, principalmente os monoterpênicos (BOLZANI et al. 1987; HENRIQUES et al. 2001; SCHRIPSEMA et al. 1999).

É interessante notar que a maioria dos compostos de uso clínico isolados das Apocynaceas são alcalóides indólicos monoterpênicos (SCHRIPSEMA et al. 2001). Esta classe de alcalóide é conhecida pela presença de derivados do triptofano, apresentando um núcleo indólico responsável pela potente habilidade de promover relevantes mudanças fisiológicas, apresentando grau variado de toxicidade (CORDELL, 1981).

A maioria dos alcalóides indólicos atuam como agonistas parciais nos receptores adrenérgicos, serotoninérgicos, colinérgicos, dopaminérgicos e noradrenérgicos. As diferentes atividades dos vários compostos se devem, aparentemente, às diferenças de atividade frente aos vários receptores e pela maneira que cada um interage com os diferentes receptores. Já que cada classe de receptor possui diversos sub-tipos, com diferente sensibilidade aos vários compostos, a gama de atividades dos alcalóides indólicos em diferentes órgãos é enorme (ROBERTS e WINK, 1998).

1.4 GÊNERO *ASPIDOSPERMA*

Espécies do gênero *Aspidosperma*, da família Apocynaceae, são encontradas apenas nas Américas (LORENZI, 1998), principalmente na Argentina, Brasil, Bolívia, México, Paraguai e Peru (WOODSON, 1951). No Brasil foram catalogadas cerca de 52 espécies desse gênero, praticamente distribuídas em todos os ecossistemas (CORRÊA, 1931), tais como caatinga, cerrado e florestas (AMORIM et al. 2005).

Várias espécies de *Aspidosperma* são conhecidas popularmente como perobas, guatambus, carapanaúba, sapopemas, pau-pereiro, amargoso e quina (CORRÊA, 1931). Apresentam grande importância tanto do ponto de vista econômico como científico, pois além de serem fornecedoras de madeira nobre, com larga aplicação na carpintaria (LORENZI, 1998; JOLY, 1991), a maioria das espécies deste gênero são objetos de extensas investigações na busca de novas substâncias com atividades biológicas (DI STASI e HIRUMA-LIMA, 2002).

Em 1951, o gênero *Aspidosperma* sofreu uma revisão sistemática, haja vista que espécies distintas vinham sendo classificadas com o mesmo nome. Esta revisão agrupou 52 espécies em nove séries, *Macrocarpa*, *Ramiflora*, *Pyricolla*, *Polyneura*, *Rigida*, *Nitida*, *Stegomeria*, *Quebrachines* e *Nobile*, levando em consideração suas características morfológicas (WOODSON, 1951). Entretanto, ainda existiam controvérsias quanto ao número exato de espécies que constituíam este gênero (ALLORGE e POUPAT, 1991).

Bolzani, em 1987, propôs uma nova classificação das espécies deste gênero, compreendendo 48 espécies em 8 séries, *Rigida*, *Nitida*, *Quebrachines*, *Polyneura*, *Pyricolla*, *Nobile*, *Macrocarpa* e *Tomentosa*, levando em consideração os aspectos quimiotaxonômicos (PEREIRA et al. 2007).

O gênero *Aspidosperma* compreende tipicamente espécies arbóreas tropicais de grande porte (2 a 60 m de altura) (WOODSON, 1951; CORRÊA, 1931), com flores e sementes abundantes, copas amplas, folhas alternas espiraladas não agrupadas no ápice dos ramos, que podem apresentar látex abundante, sendo que as mesmas não apresentam látex no tronco circular como a maioria das Apocynaceae (VICENTINI e OLIVEIRA, 1999).

Gilbert (1966) estudou 33 espécies de *Aspidosperma* de ocorrência no Brasil, resultando no isolamento de mais de 100 alcalóides indólicos, o que levou a conclusão da predominância desta classe de alcalóides neste gênero. Especificamente foi

observada a ocorrência de alcalóides indólicos com uma grande variedade estrutural, dos quais, muitos deles contendo esqueleto β -carbonílico simples, sistemas tricíclicos de anéis pirido-indólicos (ALLEN e HOLMSTEDT, 1980).

Pereira et al. (2007) realizaram um vasto levantamento das estruturas dos alcalóides indólicos identificados em espécies do gênero *Aspidosperma*, nesta revisão foi possível observar a diversidade estrutural de cerca de 247 alcalóides indólicos isolados até o ano de 2006, neste gênero. Com intensificação dos estudos fitoquímicos sobre os alcalóides de *Aspidosperma*, pode-se obter uma correlação entre a classificação taxonômica de 52 espécies proposta por Woodson (1951) e a correlação química de 33 espécies proposta por Gilbert (1966).

Del Vitto et al. (1997) realizaram a catalogação de 273 espécies de uso popular como medicamento na Argentina, das quais a *Aspidosperma quebracho blanco* relatada como antidiabético, antiasmático, cicatrizante e febrífugo.

O extrato de *A. quebracho blanco* é usado para o tratamento da disfunção erétil e este efeito tem sido atribuído ao seu conteúdo de ioimbina, que é mais um inibidor seletivo dos receptores α_2 -adrenérgicos, um agente simpatolítico cujos efeitos mais pronunciados são a vasodilatação periférica, mas diferentemente ao uso da substância pura, o extrato não é seletivo ao se ligar aos receptores α_1 ou α_2 (SPERLING et al. 2002).

Os extratos etanólicos de folhas, raízes e caules de *A. polineuron* (peroba rosa) foram avaliados quanto à atividade antifúngica contra *Cladosporium herbarum*, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Candida albicans*, *Trichoderma harzianum*, *Rhizoctonia* sp, para que houvesse justificativas biológicas que embasasse seu estudo fitoquímico.

Dessa forma foram testados os extratos etanólicos das folhas, raízes e caules dessa espécie, mas apenas o extrato etanólico do caule foi capaz de inibir o crescimento de *C. herbarum* (FERREIRA et al. 2003). Estudos semelhantes foram conduzidos por Granato et al. (2005) que testaram o extrato etanólico de rejeitos de indústria madeireira de *A. polineuron*, resultando em atividade positiva contra *Pseudomonas mirabilis*, neste caso foram obtidos dados de espectroscopia de ultravioleta os quais demonstraram grande similaridade com valores descritos na literatura para o alcalóide polineurina o principal alcalóide indólico isolado das cascas e das folhas de *A. polineuron* (MARQUES, 1988),

espécie reconhecida também por apresentar alcalóides quaternários nas raízes (ALVES, 1991).

Do total de 114 extratos de 88 espécies de plantas diferentes ocorrentes na Mata Atlântica no Estado de São Paulo, somente os extratos de folhas e cascas do caule de *A. ramiflorum* (guatambu) mostraram atividade antibacteriana contra *E. coli* (AGRIPINO et al. 2004).

A atividade antibacteriana de extratos etanólicos de outras espécies de *Aspidosperma*, como *A. dispernum*, *A. olivaceum*, *A. pyrifolium*, *A. pyricollum*, *A. polyneuron* e *A. ramiflorum* foi observada em bactérias Gram positivas e negativas (OLIVEIRA et al. 2005).

Tanaka et al. (2006), demonstraram que os extratos metanólicos de *Aspidosperma ramiflorum*, tiveram ação contra bactérias gram-positivas enquanto que as frações alcaloídicas desta espécie foram mais eficazes contra bactérias gram-negativas.

As cascas do caule de *A. nitidum* são utilizadas por nativos em várias partes do Brasil para tratamento da malária (BRANDÃO et al. 1992). Os índios Makunas e Taiwanos relatam que o látex desta árvore é eficaz na cura de lesões provocadas pela hanseníase (TCA, 1995). No estado do Amapá, a espécie *A. nitidum* é utilizada no tratamento de bronquites e diabetes, e em Manaus é utilizada como antiinflamatória, cicatrizante e contraceptiva (TCA, 1995).

Pereira et al. (2006) tomando por base que *A. nitidum* era utilizada no tratamento de inflamações, avaliaram a atividade antinociceptiva do extrato etanólico do cerne, através dos testes de nocicepção induzida por formalina, da latência para o reflexo de retirada da cauda ("tail-flick"), de performance motora ("rota-rod"), e edema induzido pela injeção intraplantar da carragenina. O efeito antinociceptivo foi detectado em 2ª. fase, indicando que não houve a participação do sistema opioidérgico e houve ainda uma redução do edema de pata em relação ao controle (PEREIRA et al., 2006).

Recentemente foi relatado o isolamento e a identificação de um novo alcalóide indólico de *A. nitidum* com um sistema 1,2,9-triazabicyclo, denominada braznitidumina que, segundo o autor, poderia justificar a atividades biológicas relatadas (PEREIRA et al., 2006).

De *A. nitidum* já são conhecidas pelo menos treze estruturas de alcalóides indólicos, merecendo destaque a aspidospermina, quebrachamina, e ioimbina,

muito comuns em outros representantes do gênero, e na sua maioria presentes nas cascas, folhas e galhos (MARQUES et al. 1996).

Com o objetivo de se descobrir substâncias menos tóxicas para o tratamento da leishmaniose, extratos de plantas brasileiras produtoras de alcalóides também foram extensamente avaliados (OLIVEIRA et al. 2002).

Assim a atividade leishmanicida do extrato alcaloídico das cascas do caule e substâncias puras de *A. ramiflorum* contra *Leishmania brasiliensis* e *L. amazonensis* foram avaliados e constatou-se uma maior efetividade contra *L. amazonensis* do que contra a *L. brasiliensis*, tanto para o extrato quanto para as substâncias puras, ramiflorina A e ramiflorina B (TANAKA et al. 2007; FERREIRA et al. 2004). O mesmo grupo de trabalho avaliou a atividade antibacteriana, e neste foram constatados resultados de inibição de crescimento de *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus* do extrato básico e das substâncias ramiflorinas A e B (OLIVEIRA, 1999; TANAKA et al. 2006), e antifúngica do extrato bruto metanólico e ramiflorinas A e B contra *Cryptococcus neoformans* (SOUZA et al. 2006).

Campos et al. (2006) observaram o efeito pró-erétil de uma fração rica em alcalóides de cascas da raiz de *A. ulei* (piquiá) comparado ao padrão ioimbina como controle positivo mediado por mecanismos dopaminérgicos, noradrenérgicos e nitrérgicos, resultados estes que, segundo os autores, juntamente com estudos posteriores serão suficientes para embasar o uso popular de extratos de *A. ulei* no tratamento da disfunção erétil. A *A. ulei* possui pelo menos cinco alcalóides indólicos isolados e identificados: 1,2-dihidro-olivacina, 1,2-dihidroelipticina, N-metil-tetrahydro-elipticina, (D)-guatambuina e uleina (MARQUES, 1988).

A *A. marcgravianum* também é uma espécie com indicações populares para tratamento da malária, além do diabetes e câncer, da qual são utilizadas suas cascas (QUIQNARD, 2003). De *A. marcgravianum* já são conhecidos cerca de 50 alcalóides indólicos, dentre os quais a reserpinina, reserpilina, aspidoscarpina, e aspidolimidina (MARQUES, 1988), que podem justificar a atividade tóxica preliminar dos extratos desta espécie nos ensaios com larvas de *Artemia franciscana* (QUIQNARD, 2003) e atividade antimicrobiana contra *E. coli*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*, *A. niger*, entre outros (VERPOORTE et al. 1982).

A atividade anticancerígena de substâncias isoladas de espécies de *Aspidosperma* também já foi avaliada, destacando-se os trabalhos com a

elipticina e seus derivados sintéticos, dos quais o elipticinium (acetato de 2-metil-9-hidroxielipticinio), é comercializado com o nome de Celiptium® (Elipticinium) na França, para o tratamento do câncer de mama (CRAGG e NEWMANN, 2005).

As subincanandinas E e F, isoladas de *A. subincanum*, apresentaram atividade citotóxica *in vitro* em células de linfoma murino L1210 (CI_{50} = 0,03 e 2,4 μ g/mL, respectivamente) e em carcinoma epidermóide humano KB (CI_{50} = 4,4 e 4,8 μ g/mL, respectivamente) (KOBAYASHI et al., 2002).

Dolabela (2007) realizou ensaios de citotoxicidade para células NiH2T3 (linhagem de fibroblastos humano) e determinado seus índices de seletividade. Os alcalóides 10-metoxi-aspidospermidina e N-formil-aspidospermidina mostraram citotoxicidade moderada, enquanto que a aspidospermidina, palosina e aspidolidina apresentaram alta citotoxicidade. Todos os alcalóides apresentaram baixo índice de seletividade (<100) (MITAINE-OFFER et al., 2002).

Da espécie *A. vargasii* foram isolados a elipticina a N-metiltetradiroelipticina. Em linhagens celulares tumorais (HL-60, MDA-MB, HCT e SF295) determinou-se a citotoxicidade, observando-se alta toxicidade (CC_{50} < 27 μ g/mL) e baixos índices de seletividades (ANDRADE-NETO et al., 2007 e HENRIQUE, 2007).

Um Levantamento etnofarmacológico realizado no município de Igarapé Mirim (PA, Brasil) revelou que a população local utiliza cascas de *Aspidosperma*, entre as quais, *A. auriculatum* (também chamada localmente de carapanaúba) para o tratamento de malária e febre (BARBOSA et al. 2003).

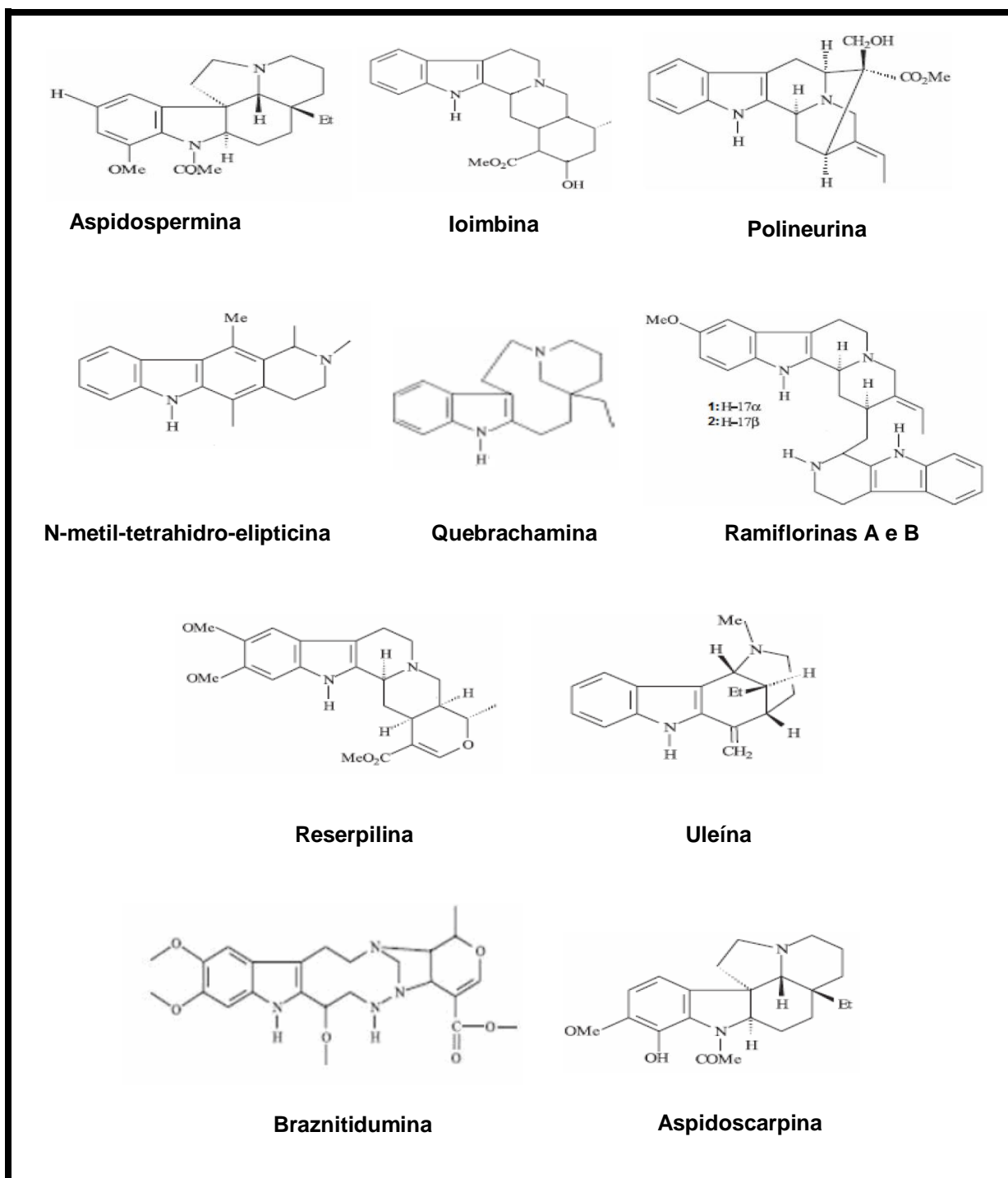
Outra espécie muito usada no Estado do Pará é a *A. nitidum*, utilizada popularmente para tratamento de inflamações do útero e ovário, no diabetes, câncer, contraceptivo e contra febre e reumatismo (WENIGER et al. 2001). As cascas dessa espécie são usadas por nativos de diferentes locais da Amazônia para a cura da malária (BOURDY et al. 2004; BRANDÃO et al. 1992).

As cascas de várias espécies de *Aspidospermas* são usadas por nativos (índios, caboclos e ribeirinhos) de diferentes locais da Amazônia para o tratamento da malária (BOURDY et al. 2004; BRANDÃO et al. 1992).

Várias espécies do gênero têm sido relatadas na literatura, como por exemplo a *A. album* (GRENAND et al. 1987), *A. discolor* (SCHULTES, 1979), *A. excelsum* e *A. polyneuron* (WASICKY et al. 2001) e a *A. nitidum* (BRANDÃO et al. 1992), cujas cascas são utilizadas por índios brasileiros contra malária.

As estruturas químicas de alguns dos mais importantes e abundantes alcalóides isolados de diferentes espécies de *Aspidospermas* estão representadas no **QUADRO 1** abaixo.

Quadro 1: Estruturas químicas de alcalóides isolados de algumas espécies de *Aspidospermas*



Outro aspecto importante é a toxicidade aguda de algumas destas espécies empregadas como medicinais. Dessa forma, o extrato metanólico das cascas do caule de *A. subicanum* foi submetido a estudos de toxicidade aguda de dose única e dose letal aproximada, não havendo resposta significativa de letalidade para nenhum dos métodos em doses de 500 mg/kg a 5000 mg/kg, caracterizando a espécie praticamente como atóxica (GOLONI et al., 2005; SANTOS et al., 2009).

Extratos etanólicos de cascas e de frações de sete espécies de *Aspidosperma*, coletadas na Reserva Ducke em Manaus, foram avaliados quanto à sua toxicidade em bioensaios empregando larvas de *Artemia franciscana*. Os extratos apresentaram baixa toxicidade (0-64%), com exceção do extrato de *A. nitidum*, que causou 97% de letalidade.

As frações alcaloídicas de *A. aracanga*, *A. desmanthun* e *A. nitidum* apresentaram letalidade > 90%. Estes mesmos extratos e frações foram avaliados quanto à letalidade para larvas (3º estágio) de *Aedes aegypti*. Apenas a *A. marcgravianum* causou 10% de letalidade. As frações alcaloídicas apresentaram atividade fraca a moderada (letalidade de 10 a 47%) (HENRIQUE, 2007).

Em estudo de Medeiros et al. (2004), foi verificado que a espécie *Aspidosperma pyrifolium* provocava mortalidade embrionária e abortos em caprinos. Em pesquisa realizada em fazendas no Seridó Ocidental e Seridó Oriental no Estado do Rio Grande do Norte, foi verificado que a espécie *Aspidosperma pyrifolium*, ocasionava abortos em caprinos, ovinos e bovinos. Alguns entrevistados mencionaram, também, a intoxicação por *A. pyrifolium* como causa de manifestações tóxicas no sistema nervoso central, em bovinos e eqüídeos (DURVAL et al. 2006).

Em outro trabalho realizado no sertão paraibano, Região Nordeste Brasileira, a espécie *A. pyrifolium* provocou surtos de abortos associados ao consumo desta planta, sendo 10 em caprinos, dois em ovinos e somente um em bovinos.

A planta existe em grande quantidade na região e é muito conhecida por causar abortos em bovinos e caprinos, sendo mais consumida pelos animais nos períodos de seca ou quando há escassez de forragem (ASSIS et al. 2009). Assis et al. (2010) verificaram que *A. pyrifolium* era uma das espécies que provocava intoxicações em ruminantes e eqüinos e isso gerava perdas econômicas no Estado da Paraíba. Lima e Soto-Blanco (2010), também relataram que a *A. pyrifolium*, era capaz de provocar aborto em ratas e relataram várias alterações histopatológicas com extrato etanólico desta planta.

1.5 *ASPIDOSPERMA EXCELSUM*

Classe: Magnoliopsida

Ordem: Gentianales

Família: Apocynaceae

Sub-família: Plumerioidae

Tribo: Plumeriae

Sub-tribo: Aspidospermatinae

Gênero: *Aspidosperma*

Espécie: *Aspidosperma excelsum* Benth

Nome científico: *Aspidosperma excelsum* Benth.(1841)

Nomes Populares: Carapanaúba, árvore do carapanã, casa de carapanã

O gênero *Aspidosperma* ocorre desde o México até a Argentina. Toda a planta é bastante amarga o que pode ser atribuído aos seus alcalóides; esse amargor até certo ponto, facilita seu reconhecimento, mesmo quando totalmente desfolhada ou sem flores ou frutos (JÁCOME et al. 2003).

No Brasil *Aspidosperma excelsum* Benth, ocorre principalmente na região amazônica e é conhecida principalmente como carapanaúba, que quer dizer “casa de carapanã”, pois as fêmeas de mosquitos (carapanãs, como são conhecidos na região) utilizam o tronco da árvore para depositar seus ovos, por acumularem água em períodos de chuva. A espécie é uma árvore de grande porte e pode chegar até 30 metros de altura, suas folhas são em formato ovalado, suas flores são aglomeradas em pequenas cimeiras terminais. O fruto, quando desenvolvido, é maduro, lenhoso, do tipo folículo, 5-6 cm de comprimento, de coloração esverdeada, apresentando formações verrugosas de cor cinza com grande quantidades de sementes (**Figura 2**) (WOODSON, 1951).



Figura 2: *Aspidosperma excelsum* Benth: **A)** Exsicata; **B)** Folhas e inflorescência; **C)** fruto.
(Fontes: www.tropicos.org; www.mobot.org).

A. excelsum Benth é uma espécie com grandes aplicações na terapêutica popular (OLIVEIRA et al., 2003). No Peru é utilizada por Índios Shipibo-Conibo, para o tratamento da hepatite e malária, e por outros nativos como afrodisíaco, vasodilatador, antiséptico, antimicrobiano, cicatrizante, como anti-hipertensivo e tratamento da bronquite. No Brasil, é utilizada como carminativa, estomáquica, contra bronquite, inflamações, febres, no diabetes, contra o câncer e a malária (MEJIA e RENGIFO, 2000; PEREZ, 2002).

Apesar das várias indicações terapêuticas e de sua grande aplicação como poderoso agente antimalárico (PEREZ, 2002) poucas pesquisas biológicas têm sido conduzidas com esta espécie. Os dados que provavelmente sustentam estas indicações etnofarmacológicas, em especial a atividade antimalárica, que é comum nas espécies do gênero, é a presença do conteúdo alcaloídico, da qual são conhecidos cerca de 18 alcalóides indólicos, entre eles a ioimbina, N-acetilaspidospermidina, excelsinina e aspexcina, (MARQUES, 1988).

A atividade antimicrobiana foi confirmada por Verpoorte et al. (1983) demonstrando a atividade inibitória no crescimento de *Bacillus subtilis* de pelo menos seis alcalóides desta espécie, todos presentes nas raízes da planta (MARQUES, 1988).

1.6 ENSAIOS *IN VITRO* PARA ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIPLASMÓDICA

Muitos dos antimaláricos atualmente utilizados, não foram desenvolvidos baseados em alvos racionalmente selecionados, mas por investigação do uso de vegetais utilizados na medicina popular, por exemplo fármacos como a quinina e artemisinina, que são derivadas de vegetais (FIDOCK et al. 2004).

Métodos de triagem *in vitro* para pesquisa de novos compostos antimaláricos ativos exigem a necessidade de culturas de *Plasmodium falciparum* em que eritrócitos humanos são infectados com o parasito e mantidos em cultura aonde novos fármacos com potencial antimaláricos são testados. Este é um teste tradicional e de baixo custo, em que baseia-se na leitura de um pequeno número de amostras de eritrócitos infectados e não-infectados em microscópio óptico (TRAGER e JENSEN, 1976).

Outra metodologia utilizada para testes *in vitro* para fármacos antimaláricos, é a marcação do *P. falciparum* com um radioisótopo. Utiliza-se [³H]-Hipoxantina, pois a hipoxantina é incorporada pelo parasita que a utiliza para síntese de DNA. Após

incorporada, a [³H]-Hipoxantina pode determinar os níveis de inibição de *P. falciparum*, utilizando técnicas de medidas de radioatividade (DESJARDINS et al. 1979).

Foi estabelecido recentemente um protocolo para estudos de quimioterápicos, em que são utilizadas cepas de *P. falciparum* modificadas com a proteína de fluorescência verde (PfGFP) que pode ser rapidamente e especificamente quantificada por citometria de fluxo (SANCHEZ et al. 2007)

Novos métodos fluorimétricos de marcação do DNA do *P. falciparum*, foram introduzidos pela PicoGreen^R (Invitrogen – Molecular ProbesTM), para verificar a susceptibilidade dos parasitas a compostos antiplasmódicos (QUASHIE et al. 2006)

Ensaio bioquímico como método colorimétrico para detecção de Lactato desidrogenase (LDH), enzima que participa na glicólise usada na via citosólica para produção de energia do *Plasmodium*. Algumas espécies de *Plasmodium* são dependentes de LDH para o metabolismo de carboidratos (WRIGHT, 2005b, FIDOCK et al. 2004, DEHARO et al. 2000)

Com o avanço do conhecimento da bioquímica do parasita da malária, o mecanismo de ação novos fármacos tem sido elucidados e novos alvos para ação de fármacos tem sido identificados. Inibidores de dihidrofolato, pirimetamina e proguanil, fazem em parte seu mecanismo de ação baseados na inibição da enzima do parasita (FIDOCK et al. 2004).

O parasita da malária possui vacúolo digestivo ácido no qual a hemoglobina de eritrócitos são hidrolisadas. Estes vacúolos aparentemente são alvos de ação de alguns antimaláricos. Em vacúolos digestivos semelhantes a lisossomos ricos em oxigênio, várias proteases do parasita (por exemplo, plamepsinsas, falcipaina 2, metalopeptidases), participam na hidrólise da hemoglobina, levando a produção de heme Fe⁺², o qual é rapidamente oxidado hematina Fe⁺³, antes de ser seqüestrado como pigmento chamado de hemozoina (também conhecido como b-hematina ou pigmento malárico). O grupo heme livre é extremamente tóxico ao parasita e também afeta o metabolismo celular por inibição enzimática, peroxidação de membranas e produção de radicais livres. Portanto, a detoxificação do grupo heme é absolutamente necessária para o ininterrupto crescimento e proliferação do parasita (DEHARO et al. 2002, SULLIVAN 2002, RHATORE et al. 2006).

Muitas das metodologias dos ensaios podem ser aplicadas a produtos naturais ou compostos sintéticos bem como também extratos vegetais. Contudo as técnicas mais utilizadas são ensaios de microscopia tradicional a radioisótopo ([³H]- hipoxantina),

os ensaios do LDH e grupo heme como alvo estão sendo explorados (WRIGHT et al., 2001; STEELE et al. 2002; AJAIYEOBA et al. 2005)

Compostos que apresentam boa atividade *in vitro* (por exemplo, $IC_{50} \leq 1 \mu M$ para compostos puros) podem ser testados contra uma série de cepas de *P. Falciparum* distintas geograficamente e com diferentes perfis de resistência aos farmacos. Esta abordagem permitirá a determinação ou não de resistência aos medicamentos existentes contra a malária reduzindo a sensibilidade do parasita para os compostos em avaliação. Extratos brutos que exibem um $IC_{50} \leq 50 \mu g/ml$ contra o *P. falciparum*, podem ser submetidos para isolamento e processos de purificação para prosseguir o desenvolvimento de produtos naturais ativos e purificados. Compostos promissores, extratos brutos e extratos semipurificadas que demonstram atividade antimalárica promissora *in vitro*, podem ser submetidos a ensaios *in vivo* para testar seus efeitos contra a malária (OLIVEIRA et al. 2009).

1.7 CONSIDERAÇÕES A RESPEITO DA AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE PLANTAS MEDICINAIS E DROGAS VEGETAIS

O uso de plantas medicinais sobre várias formas de apresentação é bastante comum em várias camadas da população brasileira. Tal hábito parte do pressuposto de que as plantas medicinais, além de possuírem atividade terapêutica, são desprovidas de efeitos tóxicos. Este aspecto é importante se considerarmos que o conhecimento sobre plantas medicinais é de domínio popular e em países em desenvolvimento, contém um forte componente social e cultural, pois estas plantas muitas vezes representam o único recurso terapêutico de muitas comunidades.

A toxicidade das plantas medicinais pode parecer trivial quando comparada com aquela apresentada pelos dos medicamentos convencionais; entretanto, a toxicidade de plantas medicinais é um problema de saúde pública (ALVES, 2007).

Assim, embora os produtos naturais tenham amplos espectros terapêuticos e baixa incidência de efeitos colaterais, não são considerados como substâncias inócuas, sendo extremamente necessária a realização de ensaios toxicológicos para fornecer a comunidade dados científicos sobre segurança ou toxicidade das plantas (ASSEMI, 2001).

Pesquisas demonstram que, a despeito da crescente importância dos medicamentos fitoterápicos, relativamente poucos trabalhos foram realizados a fim de comprovar sua eficácia e segurança, e muitas plantas ainda são usadas somente com base em informações etnofarmacológicas (TUROLLA e NASCIMENTO, 2006).

Portanto, o estudo farmacológico das drogas vegetais, constitui um passo importante na aquisição de novos conhecimentos científicos e aprimoramento da medicina tradicional, permitindo que os resultados dos estudos farmacológico e clínico-farmacológico sejam retomados à população, com identificação da espécie, parte empregada, modo de preparo, melhores informações de uso e segurança e eficácia assegurada (SIXEL e PECINALLI, 2005).

O estudo toxicológico das plantas medicinais e drogas vegetais é alvo de investigações de muitos estudiosos desde antigas civilizações. Apesar de possuírem potencial curativo, as plantas medicinais possuem substâncias que, dependendo da dose, podem ser tóxicas ao organismo, causando reações indesejáveis ou até mesmo levar a óbito. Uma mesma planta pode conter partes medicinais e terapêuticas e também partes com substâncias tóxicas prejudiciais ao organismo humano e animal.

Com o avanço da indústria farmacêutica mundial, a farmacologia e a toxicidade dos componentes químicos das plantas são elucidadas dia a dia, de modo a estabelecer as doses terapêuticas e tóxicas de forma precisa e conhecer as possíveis interações com outros fármacos, o que garante o promissor uso mundial dos fitoterápicos, em uma medicina consciente e eficaz (OGA, 1996).

Para o desenvolvimento de novos medicamentos, é necessária a realização de estudos pré-clínicos que consiste de testes em animais de laboratório e uma fase clínica ou testes clínicos, quando os medicamentos são testados nos seres humanos. A fase pré-clínica tem por objetivo principal o fornecimento de informações suficientes acerca da farmacologia e toxicologia da substância em análise para que assim possam ser realizados estudos clínicos com uma margem de segurança razoável e pré-estabelecida (PIVETTA, 2006).

Os estudos toxicológicos, aplicados em animais de laboratório e sob condições previamente estabelecidas, permitem determinar os possíveis efeitos de substâncias em humanos ou animais expostos às mesmas (BARROS e DAVINO, 2003).

A avaliação toxicológica é realizada com ensaios biológicos em animais e os resultados são extrapolados para humanos. Nestes casos, os exames hematológicos, bioquímicos, a autópsia geral, a histopatologia e a manutenção do grupo controle para

fins de comparação devem ser realizados, bem como a avaliação do estado geral dos animais e a observação dos efeitos tóxicos (LIMA, OLIVEIRA e NAGEM, 2003).

Os efeitos tóxicos observados no homem encontram-se geralmente, na mesma faixa de concentração daqueles dos animais de laboratório. Soma-se ainda o fato de que a exposição de animais a agentes tóxicos em doses elevadas é um método necessário e válido para a descoberta de possíveis perigos para a espécie humana que é exposta a doses muito menores (KLAASSEN, 2006; BARROS e DAVINO, 2003).

A avaliação toxicológica de produtos em organismos vivos pode envolver a avaliação dos efeitos obtidos após 24 horas da administração (toxicidade aguda) ou após administrações em doses repetidas (toxicidade sub-crônica e crônica).

Por definição, a toxicidade aguda avalia o efeito nefasto produzido dentro de um curto período de tempo e que resulta da administração de uma dose única ou de várias doses de uma substância em um período de 24 horas (BRITO, 1994).

A toxicidade aguda é uma avaliação estimativa e preliminar das propriedades tóxicas de uma substância, fornece subsídios a cerca dos riscos à saúde resultantes de uma exposição de curta duração (BRITO, 1994). Neste contexto, este estudo foi realizado visando servir de alicerce para estabelecer um regime posológico para pesquisas sobre toxicidade crônica (com doses repetidas), além de proporcionar informações iniciais sobre o modo de ação tóxico do fármaco em questão.

A avaliação de toxicidade aguda tem por objetivo caracterizar a relação dose/resposta que conduz ao cálculo da DL₅₀ (dose letal mediana). Este parâmetro é útil para se identificar a toxicidade relativa da substância frente a uma população animais de experimentação. Além da letalidade, outros parâmetros são investigados em estudos de toxicidade aguda como o potencial tóxico em órgãos específicos, indicativos sobre a toxicocinética e mecanismos de ação, estabelecimento das doses para estudos complementares de toxicidade entre outros (VALADARES, 2006).

Entretanto, depois de anos de debates, o teste de DL₅₀ foi banido das diretrizes que norteiam a avaliação de toxicidade aguda (BOTHAM, 2002). Hoje, são empregados três métodos alternativos em animais que trouxeram uma significativa melhora do bem-estar dos animais de experimentação.

O teste de toxicidade aguda por dose fixa, preconizado pela Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD), é um destes métodos alternativos, que avalia a toxicidade aguda oral, na qual se evita utilizar o critério morte

dos animais como objetivo final e propõe a observação do aparecimento de sinais de toxicidade decorrentes da exposição a uma série de doses fixas; permitindo, desta forma, classificar a substâncias testada de maneira compatível com o sistema empregado pela União Européia, o qual qualificava pelos valores de DL_{50} oriundos do teste clássico de toxicidade aguda (OECD 420, 2001; VALADARES, 2006).

Alguns testes toxicológicos preliminares são realizados com o intuito de se pesquisar a atividade de produtos naturais de maneira mais rápida e sem a necessidade de animais para experimentação, que cada vez mais estão sendo submetidos a um controle rigoroso de aceitação. Estes são os chamados testes toxicológicos *in vitro*.

Durante o “*Workshop*” Internacional organizado pela ICCVAM (*Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods*) em 2002, a situação corrente dos métodos *in vitro* para a avaliação da toxicidade aguda oral foi estudada. Deste estudo, um processo foi iniciado para oferecer objetivos realísticos em curto prazo e longo prazo para o refinamento e substituição de estudos animais, pelo menos para a toxicidade aguda oral, sendo os mesmos princípios aplicáveis a toxicidade dérmica e inalatória (ICCVAM, 2003).

Embora naquele momento os ensaios de citotoxicidade *in vitro* ainda não estivessem padronizados e validados, ou mesmo existissem protocolos otimizados e modelos preditivos, estudos consistentes da literatura apontavam para uma correlação positiva entre citotoxicidade *in vitro* e efeitos tóxicos agudos *in vivo*, a aplicação de métodos *in vitro* tinha um importante potencial. O documento final concluiu que a proposta de Spielmann et al.(1999), na qual a citotoxicidade basal medida em um ou mais células ou linhagens celulares e relacionada com a toxicidade aguda *in vivo*, poderia ser rapidamente absorvido para otimizar a seleção de dose inicial nos testes de toxicidade aguda já propostos. Todavia, também foi concluído que a substituição de testes em animais pelos ensaios *in vitro* ainda era prematura e necessitaria de muito mais tempo para ser implementada. Conclusões adicionais foram o desenvolvimento, padronização e a validação de métodos *in vitro* para a predição de toxicidade em humanos ao invés de roedores a serem conduzidas como medidas a longo prazo (SPIELMANN et al.1999).

A citotoxicidade basal é definida como “os efeitos adversos resultantes da interferência com estrutura e/ou processos celulares essenciais para a sobrevivência, proliferação e/ou função comum a todas as células do organismo” (EKWALL, 1995). A

avaliação da citotoxicidade basal é importante, uma vez que as funções celulares basais suportam as funções celulares órgãos-específicas. A citotoxicidade basal é expressa como CI_{50} (concentração que inibe 50% das células quando comparado às células controle não-tratadas), a qual pode ser matematicamente calculada à partir da curva de concentração-efeito.

Vários métodos aplicados para testar a toxicidade geral são úteis na toxicologia *in vitro*. Como regra geral, as células são expostas a diferentes concentrações de um produto químico por um dado período de tempo, sendo posteriormente a função celular mensurada utilizando diferentes alvos.

As metodologias que utilizam tecidos e células vivas são as mais empregadas, pois a intrínseca complexidade celular é mantida. As células utilizadas podem ser de vários tecidos, tanto de origem humana quanto animal, sendo que a sobrevivência e ou proliferação celular podem ser avaliadas por contagem do número de células ou pelo uso de corantes vitais (CRUZ, 2003).

Os ensaios mais freqüentemente empregados para a avaliação de citotoxicidade basal e verificação da viabilidade celular pelo uso de corantes vitais são o teste de redução do MTT e o teste da captação do corante vermelho neutro.

Mosmann (1983) e Borenfreud e Puerner (1984) descreveram uma técnica para quantidades elevadas de amostras, onde as células são semeadas em microplacas e a viabilidade celular é avaliada por métodos colorimétricos, utilizando a redução do MTT ou a incorporação do vermelho neutro, os quais são quantificados por espectrofotometria. Esta técnica é rápida e quantitativa, pois permite avaliar várias concentrações do produto e calcular a concentração que causa 50 % de morte celular (CRUZ, 2003).

Assim, a realização deste trabalho se justifica não somente nos usos etnofarmacêuticos e etnobotânicos como também pela presença de alcalóides de várias destas espécies de *Aspidospermas* (quimiotaxonomia), estudos de outras espécies que já demonstraram atividade antiplasmódica contra diferentes cepas de *P. falciparum* e a carência de estudos toxicológicos consistentes, em particular desta espécie.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar uma abordagem fitoquímica do extrato hidroetanólico a 70% v/v do pó das cascas do tronco de *Aspidosperma excelsum* Benth. (EHEAe), avaliar a atividade antiplasmódica *in vitro* e realizar uma avaliação preliminar da toxicidade deste extrato.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar um estudo preliminar fitoquímico extrato hidroetanólico a 70% v/v a partir do pó das cascas secas do tronco de *A. excelsum* Benth;
 - Avaliar a atividade antiplasmódica *in vitro* do EHEAe e frações (alcaloídica e metanólica);
 - Avaliar a citotoxicidade do EHEAe e fração alcaloídica;
 - Realizar o teste de toxicidade aguda oral do EHEAe.
-

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CONDIÇÕES DE COLETA E OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

O material vegetal foi coletado de um único espécime (**Figura 3**), localizado nas matas de Santa Luzia, no Município de Acará, próximo a Belém/PA (01°31'54.00" S e 48°25'51.50" O) (**Figura 4**) a aproximadamente 25 m acima do nível do mar. A coleta das cascas do tronco foi realizada no dia 29 de agosto de 2009, no horário de 12:15 h – 13:10 h, com temperatura ambiente de 32,6 °C e umidade relativa local de ± 84%. Todas as aferições foram feitas utilizando aparelho de GPS ETREX H (GARMIN, USA) e termo-higrômetro digital HT-210 (INSTRUTHERM, Brasil).

As cascas foram acondicionadas em saco plástico para transporte, pesadas (7,8 kg) e deixadas em bancada por 2 dias, à temperatura ambiente, no Laboratório de Processamento de Material Vegetal da Faculdade de Farmácia da UFPA, para uma secagem preliminar.

3.2 IDENTIFICAÇÃO

Procedida à coleta do material vegetal, partes aéreas da planta também foram coletadas para identificação. Após secagem adequada, foi confeccionada uma exsicata deste material, segundo técnica descrita em Barbosa (2001).

O material foi identificado por comparação pelo Dr. Mário Augusto G. Jardim, botânico do Museu Paraense Emílio Goeldi (MPEG), como sendo *Aspidosperma excelsum* Benth.(1841) (Apocynaceae). Exemplares que foram utilizados para comparação com a exsicata estão depositados no Herbário do MPEG sob os números MG 15.470, MG 15.860 e MG 82.422.



Figura 3: *Aspidosperma excelsum*, espécime do qual foram retiradas amostras de cascas do tronco para a realização do estudo.

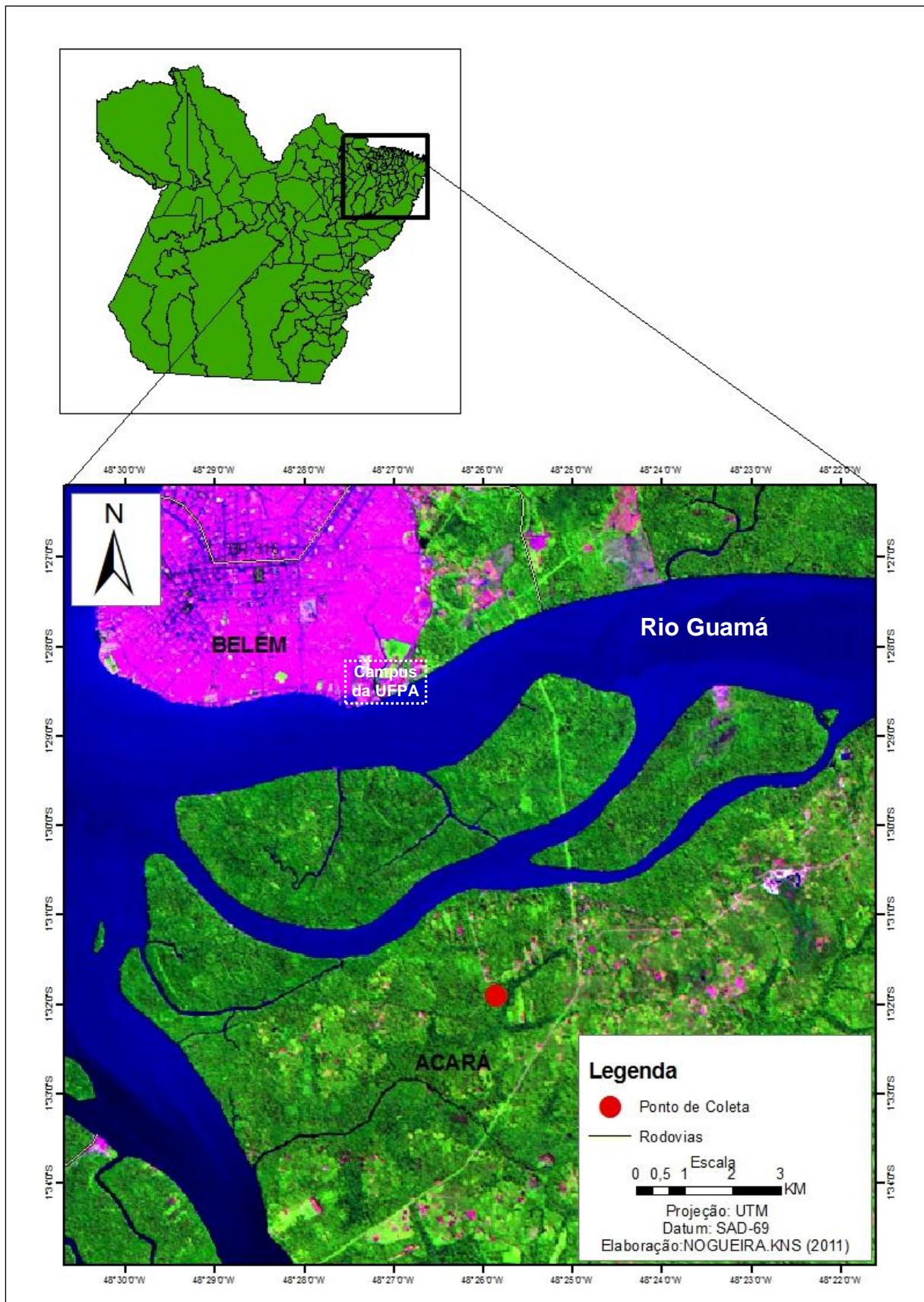


Figura 4: Mapa de localização do ponto de coleta das cascas de *A. excelsum* Benth.

3.3 PREPARAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

As cascas do tronco coletado foram selecionadas, retiradas as sujidades e contaminações e limpas com auxílio de escovas de cerdas rígidas e levemente raspadas (para retirada do musgo, algas e líquens). A seguir, o material limpo foi cortado em fragmentos de 3-6 cm² e imersos rapidamente em uma solução hidroetanólica a 70 % v/v para retirada de demais contaminantes e impedir a proliferação de microorganismo. Em seguida, as cascas foram deixadas em bancada por um dia, à temperatura ambiente, para a primeira secagem. As cascas fragmentadas foram secas em estufa (QUIMIS) com corrente de ar a aproximadamente 45 °C até secar completamente e atingir peso constante.

Depois de secas, as cascas foram pulverizadas em moinho de facas inoxidável (MARCONI) com tela média até a obtenção de um pó e este, após tamização, foi classificado como pó grosso (dados não mostrados).

3.4 PREPARAÇÃO DO EXTRATO HIDROETANÓLICO A 70% V/V DO PÓ DAS CASCAS DO TRONCO DE *A. EXCELSUM*

O extrato hidroetanólico 70 % v/v foi preparado segundo a Farmacopéia Brasileira IV (1988): 500 g do pó das cascas do tronco de *A. excelsum*, como obtido no item 3.3, permaneceram em maceração em etanol a 70% v/v na proporção de 1 parte do pó para 10 partes da solução hidroetanólica 70 % v/v, por 10 dias com agitação periódica. O extrato hidroetanólico resultante foi filtrado sucessivas vezes através de folhas de papel de filtro Whatman[®] analítico em funil e frasco kitasato e concentrado em evaporador rotativo (modelo 802 série 72025 FISATOM[®] equipado com bomba de vácuo modelo TE-058) a 45° C. Em seguida, o material foi transferido para frascos de vidro de boca larga e levado à estufa a 40 °C por 2 dias para evaporação do solvente. O extrato concentrado resultante (EHEAe) (**Figura 5**) foi mantido em refrigerador, em frascos protegido da luz. Uma parte do EHEAe foi liofilizada (liofilizador LIOTOP[®] equipado com bomba de vácuo modelo TE-058), obtendo-se como resultado final um produto com uma estrutura porosa livre de umidade e capaz de ser reconstituída pela simples adição de água. O EHEAe liofilizado foi usado nos ensaios preliminares de toxicidade.

A etapa 3.3 e parte da etapa 3.4, descritas acima, foram realizadas no Laboratório de Processamento de Material Vegetal da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Pará (UFPA).

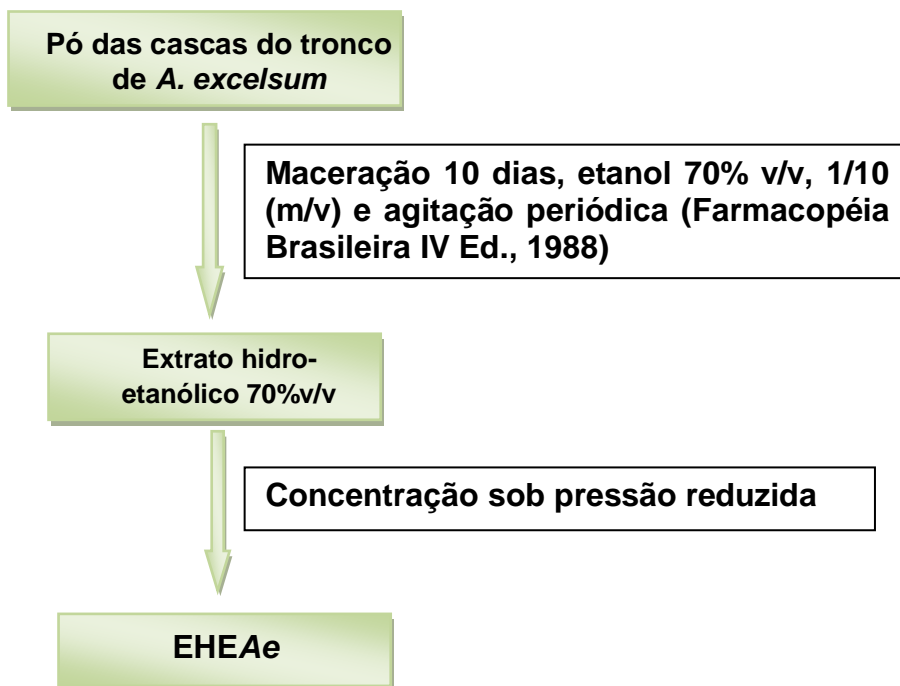


Figura 5: Esquema da obtenção do EHEAe

3.5 OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES (HEXÂNICA, CLOROFÓRMICA, ACETATO DE ETILA E METANÓLICA) E EXTRAÇÃO ÁCIDO-BASE (FRAÇÕES ALCALOÍDICAS)

As frações hexânica, clorofórmica, acetato de etila e metanólica foram obtidas a partir do tratamento de 2,0 g do EHEAe com hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol, respectivamente (Figura 6).

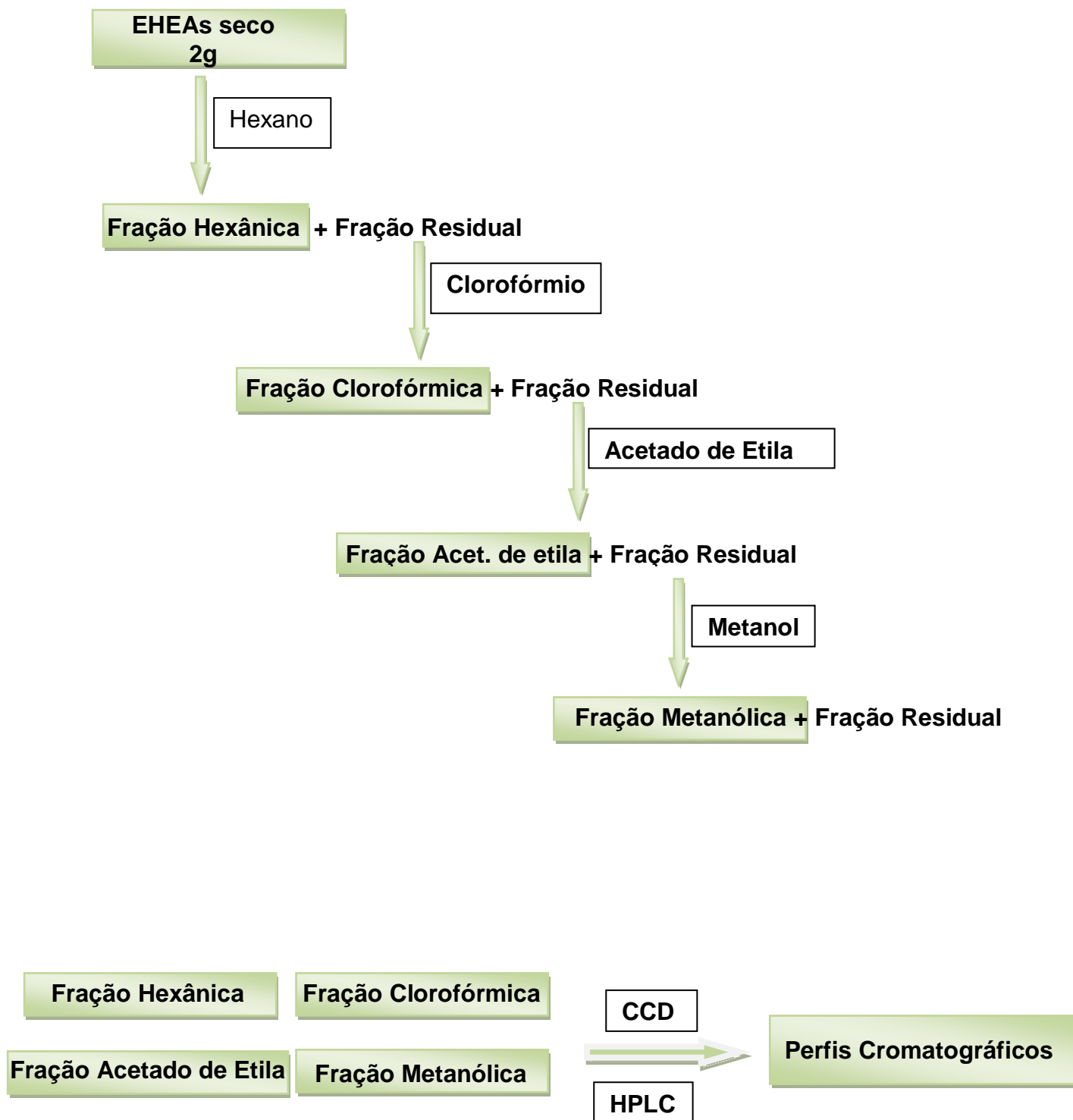


Figura 6: Obtenção das frações a partir do EHEAe com solventes de polaridade crescente

As frações alcaloídicas foram preparadas e obtidas diretamente a partir do tratamento do pó das cascas, EHEAe e EHEAe em solução aquosa. O pó das cascas (fração alcaloídica A1) e o EHEAe (fração alcaloídica B1) foram tratados com HCl (Ácido Clorídrico) 1%, na proporção de 1:40 (m/v) e o EHEAe em solução aquosa com HCl concentrado p.a. na proporção de 1:2 v/v (fração alcaloídica C1). Em seguida, as soluções ácidas oriundas de todas as extrações, foram alcalinizadas com NH_4OH (Hidróxido de Amônio), e conseqüentemente foi feita uma partição utilizando como solvente de extração hexano, obtendo-se as frações alcaloídicas A2, B2, C2. A cada extração uma pequena amostra era retirada e aplicada em placa cromatográfica de CCD e borrifada com reativo de Dragendorff (*Spot-test*, teste rápido). Este procedimento foi realizado em todas as extrações até resultado negativo com Reativo de Dragendorff, indicando a ausência de alcalóides. Após *spot-test* negativo, as três soluções foram alcalinizadas até pH 10 com NH_4OH , seguido de outra extração líquido-líquido com clorofórmio até *spot-test* negativo também utilizando o reativo de Dragendorff (**Figura 07**).

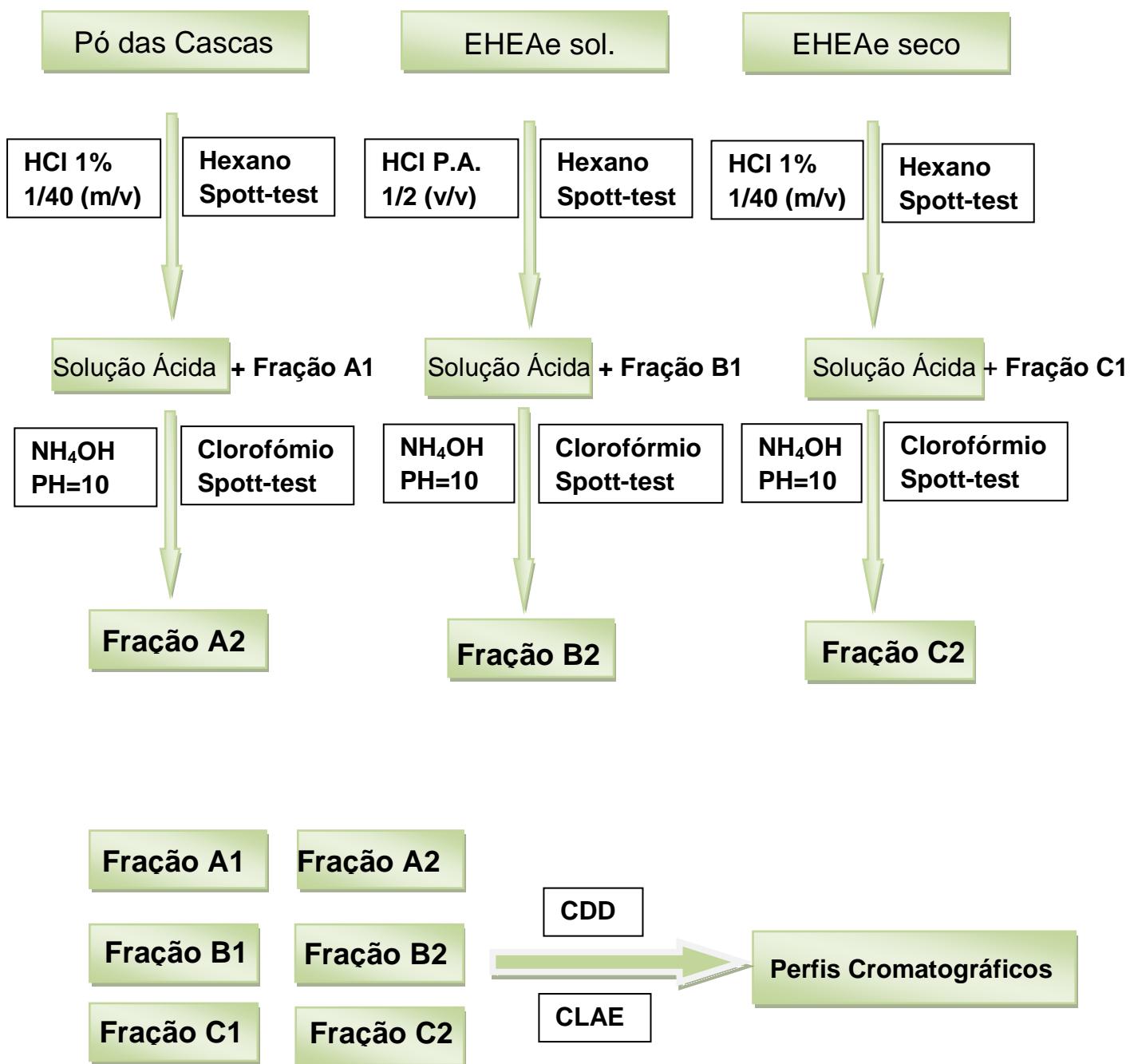


Figura 7: Obtenção das Frações Alcaloídicas.

3.6 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA DO EXTRATO

A prospecção química do EHEAe foi realizada com a finalidade de identificar a presença de classes de metabólitos secundários na espécie em estudo. Dessa forma, realizaram-se testes para saponinas, ácidos orgânicos, açúcares redutores, polissacarídeos, fenóis e taninos, proteínas e aminoácidos, flavonóides gerais, glicosídeos cardíacos, catequinas, derivados de benzoquinonas, naftoquinonas, fenantroquinonas, lactonas sesquiterpênicas e outras lactonas, alcalóides, purinas, esteróides, triterpenóides, azulenos, carotenóides, depsídios, depsidonas, derivados da cumarina e antraquinonas. Os testes foram realizados em triplicata e seguiram as condições estabelecidas em Barbosa (2001), como se segue:

- **SAPONINAS ESPUMÍDICAS**: dissolveram-se 5 mg do extrato bruto em 5 mL de água destilada. Em seguida, completou-se o volume para 15 mL e, em tubo fechado agitou-se vigorosamente por 2 minutos. O resultado positivo é caracterizado pela formação de camada de espuma permanente por mais de 30 minutos.
 - **AÇUCARES REDUTORES**: dissolveu-se 5mg do extrato bruto em 5mL de água destilada dentro de tubo de ensaio. Filtrou-se a solução. Adicionou-se 2mL do reativo de Fehling A e 2mL do reativo de Fehling B. Em seguida, o tubos de ensaio foi aquecido em banho-maria durante 5 minutos. O aparecimento de precipitado vermelho-tijolo indica a presença de açúcares redutores.
 - **ÁCIDOS ORGÂNICOS**: dissolveu-se 5 mg do extrato bruto em 5 mL de água destilada; em seguida, transferiu-se 2 mL para um tubo de ensaio onde se adicionou gotas de reativo de Pascová de cor esverdeado. O aparecimento da descoloração da solução indica positividade para ácidos orgânicos.
 - **POLISSACARÍDEOS**: Dissolveu-se 5mg do extrato bruto em 5mL de água destilada. A solução foi filtrada, e em seguida, foram adicionadas duas gotas de Lugol. O resultado é considerado positivo quando a solução adquire coloração azulada.
 - **PROTEÍNAS E AMINOÁCIDOS**: dissolveu-se 5 mg do extrato bruto em 3 mL de água destilada em tubo de ensaio e adicionou-se 0,5 mL de solução aquosa de níhidrina a 1%; em seguida, a solução foi levada para aquecimento até ebulição. O aparecimento de cor violeta persistente indica reação positiva.
-

- **FENÓIS E TANINOS:** Dissolveu-se 5mg do extrato bruto em 5mL de água destilada. Em seguida, foi adicionada duas gotas de FeCl_3 (Cloreto Férrico) a 1%. O resultado deve ser comparado com um tubo teste em branco (água + solução de FeCl_3). A visualização de mudança de coloração ou formação de precipitado indica resultado positivo. O aparecimento de coloração inicial entre azul e vermelho indica a presença de fenóis, e a formação de precipitado escuro de tonalidade azul indica a presença de taninos pirogálicos (taninos hidrolisáveis) e verde, presença de taninos catéquicos.
 - **CATEQUINAS:** dissolveu-se alguns miligramas do extrato bruto em 3mL de metanol. Juntou-se 1mL de solução aquosa de Vanilina a 1% e 1mL de HCl concentrado. O aparecimento de cor vermelha indica reação positiva.
 - **GLICOSÍDEOS CARDÍACOS:** Dissolveu-se 25 mg do extrato bruto em 5mL de metanol, filtrou-se e dividiu-se duas alíquotas de 2mL cada. Foram adicionadas a estas porções gotas do reativo de Keede. O surgimento de coloração azul ou violeta indica reação positiva.
 - **FLAVONOÍDES GERAIS:** 5mg do extrato bruto foi dissolvido em 10mL de metanol. A solução foi filtrada, e em seguida, foi adicionada três gotas de HCl concentrado e raspas de magnésio. O resultado positivo é caracterizado pela mudança de cor da solução para rósea.
 - **ALCALOÍDES:** Dissolveu-se 5mg do extrato bruto em 5mL de solução de HCl a 5%. Esta solução foi filtrada e dividida em três alíquotas de 1mL em tubos de ensaio, dos quais dois tubos, do extrato, foram reservados para testes com diferentes reativos e um tubo como teste em branco. Os reativos utilizados e suas respectivas indicações de presença de alcalóides são listados, a seguir:
 - Reativo de Dragendorff – o aparecimento de precipitado vermelho-tijolo.
 - Reativo de Mayer – a formação de precipitado branco.
 - **SESQUITERPENOLACTONAS E OUTRAS LACTONAS:** dissolveu-se 25 mg do extrato bruto em 3 mL de metanol, filtrando a solução logo em seguida. Depois, colocou-se 12 gotas de solução alcoólica de cloridrato de hidroxilamina a 10% e duas gotas de solução metanólica de hidróxido de potássio (KOH) a 10%. Aqueceu-se suavemente a solução em banho-maria durante 2 minutos. Em seguida, esfriou-se e acidificou-se a solução com ácido clorídrico (HCl) a 1N. No
-

fim, adicionou-se uma gota de FeCl_3 1%. O aparecimento de coloração violeta indica reação positiva.

- **ESTERÓIDES E TRITERPENÓIDES**: dissolveu-se 25 mg do extrato bruto em 10 mL de clorofórmio, filtrando sobre carvão ativado a solução. Transferiu-se o filtrado para um tubo de ensaio seco e se adicionou 1 mL de anidrido acético e duas gotas de ácido sulfúrico concentrado sob agitação suave. O aparecimento de cores, que podem ir do azul ao verde indicam resultado positivo.
- **DEPSÍDIOS E DEPSIDONAS**: dissolveu-se 25 mg do extrato bruto em 5 mL de éter etílico. Evaporou-se todo o éter etílico em banho-maria e se juntou ao resíduo 3 mL de metanol. Em seguida, agitou-se a solução metanólica e se adicionou 3 gotas de solução de FeCl_3 1%. O aparecimento de cor verde, azul ou cinza, indica reação positiva.

3.7 OBTENÇÃO DO PERFIL CROMATOGRÁFICO EM CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD) E EM CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) DO EHEAe E FRAÇÕES ALCALOÍDICAS

O EHEAe e as frações alcaloídicas foram submetidos a Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e ou Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Para CCD foi utilizado a técnica de cromatografia por adsorção em gel de sílica (Sílica Gel 60 GF MERCK) em cromatoplasmas de gel de sílica em suporte de vidro. Os eluentes utilizados foram: Clorofórmio:Acetato de Etila:Metanol:Dietilamina (45,5:45,5:8:1); Clorofórmio: Metanol (95:5); Clorofórmio:Metanol: NH_4OH (95:5:0,05) e Hexano:Acetato de Etila: Metanol:Dietilamina (5,5:3,5:0,8:0,2).

Após a aplicação das amostras na cromatoplasma e a eluição com a mistura de solventes, estas foram observadas em luz ultra-violeta em $\lambda = 254$ nm e 365 nm, e posteriormente borrifadas com reativo de Dragendorff.

A cromatografia preparativa do EHEAe, feita das regiões em que ocorreram separações bem definidas, foi feita em placas com suporte de alumínio e fase estacionária de gel de sílica (MERCK). Estas regiões foram coletadas e posteriormente levadas para análise em CLAE. Assim, o EHEAe foi cromatografado com mesmo sistema de eluição descrito acima (clorofórmio/acetato de etila/metanol/dietilamina (45,5:45,5:8:1) e a mancha de $R_f = 0,4$ foi separada da placa,

processada (eluída com metanol) e 20 µL desta solução foi injetada em um cromatógrafo de alta eficiência (LaChrom 7000 MERCK HITACHI) em coluna de fase reversa RP 18 (Agilent LiChrospher 100[®], 250 x 4,6 mm), equipado com detector de UV e arranjo de fotodiodos (Modelo L-7455 LaChrom MERCK HITACHI). Sistema de eluição: eluente A (H₂O, pH=3); eluente B (Acetonitrila): Fase móvel: A 90% - B 10% em 0 minutos; A 60% - B 40% em 30 minutos; A 10% - B 90% em 32 minutos. Fluxo: 0,8mL/min. A detecção foi acompanhada com sistema de fotodiodos (DAD) entre 200 e 400 nm. O cromatograma foi observado em comprimento de onda de 250 nm (mesmas condições que foi realizada a cromatografia do padrão ioimbina)

Todos os solventes utilizados foram de altíssima pureza (grau HPLC).

Parte da etapa 3.4 e as etapas 3.5 à 3.7, descritas acima, foram realizados no Laboratório de Fitoquímica e Cromatografia Líquida da Faculdade de Farmácia da UFPA.

3.8 ATIVIDADE ANTIPLASMÓDICA *IN VITRO* PELO MICROTESTE EM CULTURAS DE *Plasmodium falciparum*

3.8.1 DISSOLUÇÃO DAS AMOSTRAS PARA A REALIZAÇÃO DOS ENSAIOS *IN VITRO*

As amostras (EHEAe e frações alcaloídica e metanólica) foram dissolvidas em metanol. Esta solução foi utilizada para a preparação de 7 diluições seriadas, que foram diretamente colocadas em uma placa de acrílico de 96 poços e o solvente foi totalmente evaporado dentro de uma câmara de fluxo laminar.

3.8.2 CULTIVO DOS ISOLADOS RESISTENTE E SENSÍVEL DO *Plasmodium falciparum*

Os parasitos foram cultivados de acordo com Trager e Jensen (1976) com pequenas modificações : O cultivo do *P. falciparum*, foi feito no Laboratório de Malária do Instituto Evandro Chagas, utilizando cepas de *P. falciparum* W2, clone que é originário da Indochina e é sensível a mefloquina e quinina e resistente a cloroquina. Após o descongelamento e, até ser observado que o crescimento do parasito em fase exponencial, utilizou-se meio de cultura RPMI completo contendo 20% de plasma (do grupo sanguíneo "O" Rh⁺). Uma vez em crescimento exponencial, passou-se utilizar meio completo contendo 10% plasma. A cultura foi mantida em estufa a 37° C, em

atmosfera de 3 a 5% de CO₂, conseguida através da queima de vela, em dessecador. A parasitemia foi diariamente determinada e, quando maior que 6%, a placa foi submetida a sincronização com sorbitol ou diluída. Diariamente, durante o cultivo de *P. falciparum*, uma gota de material foi retirada e utilizada para a confecção de lâmina contendo a gota espessa e o esfregaço. A gota espessa foi secada à temperatura ambiente, seguindo-se sua desesoglobinização com azul de metileno e coloração com Giemsa, por 20 min. O esfregaço foi feito em temperatura ambiente, fixado com metanol e corado com Giemsa, por 20 min. As lâminas foram lavadas com água tamponada, secadas a temperatura ambiente e examinadas ao microscópio óptico, com objetiva de imersão (1000x).

As parasitemias nos esfregaços corados foram determinadas pela contagem do número de hemácias infectadas em 2000 células, no caso de parasitemia elevada (>10%). No caso de parasitemia menor que 10%, foi feita uma estimativa do número de hemácias por campo, e calculado número de campos que deveriam ser contados para se obter um total de 5.000 a 10.000 hemácias

3.8.3 MICROTESTE TRADICIONAL

Hemácias parasitadas com aproximadamente 0,5-1% de parasitemia, com predomínio de formas jovens, foram ressuspendidas em meio completo para hematócrito de 2,5% e esta suspensão foi distribuída em microplacas (96 poços). A cada poço foi acrescentado a solução de diferentes concentrações do EHEAe, frações e como controle foi usado o fármaco antimalárico quinina. Após 24 e 48 horas de incubação a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂, o meio de cultura de cada poço foi substituído. Com 72 horas foram confeccionados esfregaços de todas as amostras os quais foram corados com Giemsa e examinados ao microscópio ótico para contagem de hemácias infectadas e determinação das percentagens de parasitemia.

As médias das parasitemias dos controles sem droga foram utilizadas na avaliação das taxas de crescimento do parasito nos poços com amostras-teste e com controles positivos. A atividade das amostras-teste é expressa pela percentagem de inibição da parasitemia em relação aos controles sem fármaco. Os

experimentos foram realizados em triplicatas e as leituras em microscópio ótico (RICKMANN et al. 1978; CARVALHO et al. 1990).

Para a determinação da CI_{50} foram utilizadas sete diferentes concentrações e foram consideradas as parasitemias médias para cada intervalo de tempo (24, 48 e 72 horas). Para o cálculo de CI_{50} foi utilizado o Grafpad Prism 6.0 e comparadas, em termos estatísticos (Teste de Bonferroni) com a CI_{50} do controle positivo (quinina).

A etapa descrita no item 3.8, foi realizada no Laboratório de Malária do Instituto Evandro Chagas.

3.9 AVALIAÇÃO PRELIMINAR DA TOXICIDADE

3.9.1 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE

A avaliação da citotoxicidade do EHEAe liofilizado e da fração alcaloídica C2 foi realizada no Laboratório de Fotoquimioproteção e Controle da Qualidade da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP de Ribeirão Preto (Ribeirão Preto/SP)

3.9.1.1 Linhagem celular e cultivo

Foram usadas células de fibroblastos (linhagem L929) de camundongos. As mesmas foram cultivadas em meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*), suplementado com soro fetal bovino (SFB) (10%), penicilina G (100U/mL), estreptomicina (100 µg/mL) e incubadas com 5% de CO_2 a 37°C. As células foram sub-cultivadas a cada 5-7 dias, usando salina 0,9% para lavá-las e tripsina 0,25% para desagregá-las do frasco. Após desagregação, essas células foram centrifugadas a 1000 rpm por 15 min. à 10°C, ressuspensas em meio DMEM incompleto (não suplementado com SFB), e para a contagem de células foi usado câmara de Neubauer. As células foram inoculadas em placas de 96 poços a uma densidade de 1×10^5 células/poço para o ensaio de toxicidade celular, incubadas a estufa a 37°C, com 5% de CO_2 . Os meios de cultura e demais reagentes utilizados no cultivo das células foram adquiridos da Gibco®.

3.9.1.2 Avaliação da citotoxicidade do EHEAe liofilizado e da fração alcaloídica pelo ensaio do MTT

O ensaio foi realizado pela técnica do MTT (brometo de 3 - (4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5 difeniltetrazolio). A técnica do MTT é um ensaio quantitativo para determinar a viabilidade celular por meio da interrupção da atividade mitocondrial. Este ensaio quantifica a formazan, produto formado pela redução do MTT. O MTT é reduzido pela succinato desidrogenase mitocondrial em células viáveis a formazana, fornecendo assim uma medida de função mitocondrial e conseqüentemente de células viáveis.

Para avaliação da citotoxicidade, o EHEAe liofilizado e a fração alcaloídica foram diluídos em 2000 μ L de solução salina. Estas soluções foram agitadas em agitador tipo vortex por aproximadamente 1min e em seguida, deixadas em banho de ultrassom por 15 min e filtrada em filtro estéril tipo Millex[®] de 0,22 μ m, e a partir desta solução foram feitas novas diluições do EHEAe liofilizado (400; 800; 1600; 3200 e 6250 μ g/mL) e da fração alcaloídica (400; 800; 1600; 3200; 6250 e 12500 μ g/mL) as quais foram avaliadas quanto à citotoxicidade. O ensaio de MTT foi realizado com base no protocolo experimental descrito por Carmichael et al. (1987).

As células sub-cultivadas, após 24h na estufa, foram inoculadas em placa de 96 poços com meio DMEM com vermelho de fenol e suplementado com SFB. As células serão incubadas em estufa a 37°C, com 5% de CO₂. Após 24h, 20 μ L de cada diluição do EHEAe liofilizado e fração alcaloídica foram adicionadas a cada poço da placa contendo as células. As células expostas a diferentes concentrações do EHEAe liofilizado e da fração alcaloídica foram reincubadas por 24h a 37°C com 5% CO₂. Após este procedimento, o meio foi substituído por 200 μ L de meio DMEM sem vermelho de fenol e sem SFB e em seguida, 10 μ L do reagente MTT (5mg/mL em tampão fosfato-salina) foi adicionado em cada poço da placa e incubado por 4h a 37°C. Após 4h, 50 μ L de SDS (duodecil sulfato de sódio) a 20% em HCl 0,01M foi adicionado em cada poço para solubilizar a formazan formada (MOSMANN, 1983). A placa foi recoberta com papel alumínio e armazenada ao abrigo da luz, por 12h. Em seguida, foi realizada a leitura da densidade óptica (D.O.) das amostras em leitor de placa de ELISA (μ Quant, BIOTEK INSTRUMENTS Inc[®].) em 570 nm. A viabilidade celular foi expressa em porcentagem de células viáveis com relação ao grupo controle (solução salina).

3.9.2 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE ORAL AGUDA

3.9.2.1 ANIMAIS E CONDIÇÕES DE ACOMODAÇÃO

Para a avaliação da toxicidade oral aguda, foram utilizados camundongos (*Mus musculus*), linhagem Swiss (var. albino), machos e fêmeas (nulíparas e não grávidas) com peso corporal inicial de 28-32 g, provenientes do Biotério do Instituto Evandro Chagas (Ananindeua/PA) e aclimatados por pelo menos 5 dias no Biotério de Experimentação da Faculdade de Farmácia da UFPA, em ambiente com temperatura controlada ($23 \pm 3^{\circ}\text{C}$), umidade em torno de 50-70%, ciclo de luz/escuro de 12 horas, baixos níveis de ruídos e com contínua exaustão de ar. Os animais foram mantidos com água filtrada e ração peletizada (Biobase-Biotec[®]) *ad libitum* em caixas de polipropileno (50 x 35 x 15 cm) com tampa metálica em aço galvanizado, forradas com palha seca de arroz, previamente esterilizada em autoclave, com número máximo de 4 animais (machos e fêmeas separados) por caixa (que foi devidamente etiquetada para constar todos os dados de consumo de ração, água, peso e estado fisiológico diário dos mesmos). Ao final dos experimentos, os animais foram anestesiados com uma mistura constituída de 2 partes de cloridrato de cetamina + 1 parte de xilazina, na dose de 2,5 mL/kg via intraperitoneal (i.p.) e os órgãos (fígado, rins, pâncreas, baço, intestinos, estômago, cérebro e coração) resseccionados para avaliação anatomo-histopatológica. As demais partes (carcaça) foram mantidas congeladas até o momento de serem recolhidas para incineração, no Instituto de Ciências Biológicas da UFPA.

Todos os procedimentos com animais seguiram as mais rígidas normas de experimentação animal, de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, segundo as Normas da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório - SBCAL (nova denominação do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal - CoBEA) e do recém-criado CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal) (Lei No. 11.794, publicada no DOU de 08/10/2008). O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética do uso de Animais de Laboratório do Instituto Evandro Chagas (CEPAN) (041/2009 CEPAN/IEC/SVS/MS) (Anexo 1).

Para o cumprimento das diretrizes preconizadas pelo Comitê de Ética do Uso de Animais de Laboratório, o trabalho envolvendo animais (manuseio, treinamento e inspeção geral da qualidade de acomodação dos animais) contou com o apoio e

supervisão do Prof. Dr. Washington Luiz Assunção Pereira, médico veterinário e patologista clínico, professor Associado II da Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA).

3.9.2.2 TESTE DE TOXICIDADE AGUDA

Para os testes de toxicidade aguda oral do EHEAe, foi adotado o Procedimento Dose Fixa, do *Guideline* 420 da OECD, na sua versão revista adotada em 2001 (OECD 420, 2001), com algumas adaptações. Este procedimento, apesar de usar menos animais do que o da DL₅₀, provê informações adequadas sobre a toxicidade das substâncias, permitindo produzir categorias de toxicidade compatíveis com os fornecidos pelo método DL₅₀, onde a morte do animal não é uma meta. Observa-se cuidadosamente o aparecimento de sinais claros de toxicidade em uma de uma série de níveis de doses fixas.

O EHEAe liofilizado foi reconstituído em água destilada e administrado por gavagem, através de sonda gástrica de aço inox de 4 cm (*Becton & Dickinson Co*). Dois grupos foram estabelecidos, um com animais fêmeas e outro com machos, ambos tratados com EHEAe liofilizado, além de dois grupos controle (machos e fêmeas) organizados de forma idêntica e tratados apenas com água destilada. Cada grupo tinha 4 animais. O volume da substância-teste administrado aos animais não excedeu 10 mL/kg de peso corporal do animal (OECD 420, 2001). Os animais em teste e os controles foram divididos em caixas de uma maneira que não impedia a observação precisa de cada um, a temperatura local, umidade e ciclo luz/escuro foram as mesmas já supracitada.

Os níveis de dose para o extrato foram estabelecidos para, no máximo, 3 doses suficientemente espaçadas (5000, 500 e 50 mg/Kg), a fim de mostrar os efeitos tóxicos e as diferentes taxas de mortalidade. Caso a dose de 5000 mg/kg não produzisse mortalidade nos grupos tratados, não haveria a necessidade de ser administrados os níveis inferiores.

Os animais foram observados durante um período de 14 dias. Os sinais de toxicidade foram registrados à medida que foram feitas as observações e que compreendam o momento de seu aparecimento, sua diminuição e sua duração.

Foi realizada uma avaliação ou *screening* hipocrático, que forneceu uma estimativa geral da natureza farmacológica e toxicológica da substância

desconhecida, como: estado consciente e disposição, atividade e coordenação do sistema motor, reflexos, atividade sobre o SNC e SNP (MALONE e ROBICHAUD, 1983). O modelo de tabela hipocrática utilizada (Anexo 2), onde os dados avaliados foram reunidos, seguiu as sugestões preconizadas por Brito (1994).

Após o procedimento de administração oral (gavagem), os animais de ambos os sexos e grupos (tratados e controles) foram observados aos 15, 30, 60, 120, 180 e 240 minutos no primeiro dia após o tratamento e uma vez por dia nos 13 dias seguintes. Ao final dos 14 dias de observação, os animais foram submetidos à eutanásia (pela mistura constituída de 2 partes de cloridrato de cetamina + 1 parte de xilazina, na dose de 2,5 mL/kg i.p.) e seus órgãos foram removidos para estudo anatomo-histopatológico.

3.9.2.2.1 Avaliação da Evolução Ponderal e Consumo de Água e Alimento

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

O consumo de água e ração foi avaliado a partir do primeiro dia após o tratamento. Para avaliar o consumo de água, um volume fixo da mesma, precisamente medido em proveta graduada, era adicionado aos bebedouros de capacidade de 250 mL. No dia seguinte, aproximadamente na mesma hora, o volume dos bebedouros era medido novamente em provetas e a diferença (quantidade consumida) era anotada. De maneira similar o consumo de ração foi avaliado. Eram disponibilizada uma quantidade exata de ração (50 g/dia/gaiola) e no dia seguinte, a diferença (quantidade consumida) era anotada.

3.9.2.2.2 Avaliação anátomo e histopatológica

Após os 14 dias de observação, os animais foram submetidos à eutanásia como descrito no item **3.10.2.1** e examinados macro e microscopicamente. Além do exame morfológico externo, como características da pele e pelos (cor, textura, densidade, espessura, comprimento dos pelos), também foram analisados macroscopicamente o cérebro e cerebelo, estômago, intestinos, mesentério, coração,

pâncreas, pulmão, fígado e rins de todos os animais. Após a detida observação macroscópica, estes órgãos foram retirados e as secções teciduais dos órgãos excisados foram fixadas em formalina (solução de formol a 10%) tamponada. Após 24 horas, estes foram resseccionados para processamento histopatológico: desidratação com séries crescentes de álcool (70 a 100%), diafanização em xilol, impregnação e inclusão em parafina, segundo os métodos habituais (BACHA e WOOD, 1990). Em micrótomo de navalhas em aço inox, os fragmentos tissulares foram seccionados em espessura de 3,0 μm em lâminas de vidro lapidadas e subseqüentemente submetidos à coloração hematoxilina-eosina e tricrômico de Masson, e examinados ao microscópio óptico.

Os estudos anátomo e histopatológicos foram realizados no Laboratório de Patologia Clínica Animal do Instituto de Saúde e Produção Animal da UFRA.

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para determinação da CI_{50} nos testes de atividade antiplasmódica, os dados foram expressos $CI_{50} \pm$ erro médio padrão e foi usado o método de regressão linear, utilizando o software GraphPad Prism 5.0 e para análise de estatística descritiva o software Biostat 5.0.

Os resultados da evolução ponderal, consumo de água e alimentos da toxicidade aguda, foram expressos como média \pm desvio padrão médio, e foram analisados utilizando o software Biostat 5.0 e como ferramenta de análise o teste “t” Student com níveis de significância em $p < 0,05$.

A análise dos resultados de viabilidade celular foi efetuada utilizando o aplicativo Microsoft Excel 2007, sendo os dados obtidos expressos como média \pm desvio padrão da média para cada grupo. Como tratamento estatístico, foi realizado a Análise de Variância (ANOVA) a um critério, seguido pelo teste *pos hoc* de Bonferroni, adotando como nível de significância $p < 0,05$ utilizando o programa estatístico BioEstat 5.0.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 RENDIMENTO DO EXTRATO HIDROETANÓLICO DAS CASCAS DE *A. EXCELSUM* E FRAÇÕES

Do material vegetal, constituído pelo pó das cascas de *A. excelsum* (500 g), utilizada para o processo extrativo, foram obtidos 36,334g de EHEAe. Portanto, o rendimento do processo extrativo foi de 7,27 %.

A massa e o rendimento das frações obtidas a partir de 2,0 g da EHEAe com solventes de diferentes polaridades após a evaporação completa dos respectivos solventes estão mostrados na **Tabela 1**. A fração metanólica, portanto, de maior polaridade, apresentou melhor rendimento.

Tabela 1: Frações obtidas a partir do tratamento do EHEAe (2,0 g) com solventes de polaridade crescente.

LÍQUIDO EXTRATOR	MASSA OBTIDA (mg)	RENDIMENTO (%)	REATIVO DE DRAGENDORFF
Hexano	64,6	3,23	+
Clorofórmio	159,9	7,99	+
Acetato de Etila	142,6	7,13	+
Metanol	978,1	48,90	+
Fração Residual	654,8	32,75	-

Nota: (+) reação positiva

O menor rendimento da fração hexânica e devido ao baixo teor de substâncias apolares ou de baixa polaridade presentes no EHEAe. Por outro lado, o maior rendimento da fração metanólica indica que este extrato é rico em substâncias com características polares.

4.2 RENDIMENTO DAS FRAÇÕES ALCALOÍDICAS

As frações alcaloídicas obtidas (massa e rendimento) do EHEAe e EHEAe em solução aquosa e diretamente do pó das cascas de *A. excelsum* estão mostradas na **Tabela 2**. A fração obtida a partir do pó das cascas foi a única que se obteve resultado positivo para a o reativo de Dragendorff, tanto na extração ácida com hexano quanto na extração básica com clorofórmio (Fração **A1** e **A2**). Para as demais, somente foi obtido resultado positivo na partição básica extraída com clorofórmio (**B2** e **C2**) (**Tabela 2**).

Tabela 2: Rendimento das frações alcaloídicas obtidas a partir do pó das cascas de *A. excelsum* e EHEAe/ EHEAe em sol. aquosa

ORIGEM DA FRAÇÃO	EXTRAÇÃO BÁSICA (CLOROFÓRMIO)	FRAÇÃO ÁCIDA (mg)	FRAÇÃO BÁSICA (mg)	FRAÇÃO ÁCIDA (%)	FRAÇÃO BÁSICA (%)
Pó das Cascas de <i>A. excelsum</i>	+	90,40 A1	141,00 A2	4,5	7,05
EHEAe (sol. aquosa)	+	0,00 B1	80,70 B2	0,0	---
EHEAe	+	0,00 C1	370,40 C2	0,0	18,52

Nota: (-) Resultado negativo para o Reativo de Dragendorff, (+) Resultado positivo para o Reativo de Dragendorff

4.3 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA DO EXTRATO HIDROETANÓLICO DAS CASCAS DE *A. EXCELSUM*

A prospecção fitoquímica do EHEAe revelou a presença de alguns metabólitos secundários, dentre eles saponinas açúcares redutores, fenóis, taninos e como se esperava, alcalóides, mas ausência de alguns metabólitos biologicamente ativos, como quinonas, terpenos e flavonóides (**Tabela 3**).

Os processos de prospecção fitoquímica são de extrema importância pois permitem identificar qual ou quais classes de metabólitos secundários estão presentes em uma dada amostra vegetal e, a partir daí, orientar a extração ou fracionamento dos extratos para isolamento dos compostos de maior interesse. Muitas substâncias, quando tratadas por determinados reativos, apresentam reações de coloração ou precipitação características, que permitem a identificação das amostras que as contêm. Além disso, algumas espécies possuem substâncias que são características; assim, sua presença ou não na amostra, permite averiguar a identidade daquele material vegetal.

É conhecido da literatura o isolamento de alcalóides de plantas pertencentes à família Apocynaceae, como, por exemplo, de espécies dos gêneros *Rauvolfia* e *Tabernaemontana*, além das *Aspidospermas* (SCHRIPSEMA et al. 2001), sendo que muitos destes apresentam atividade biológica intensa, incluindo um grande potencial antimalárico (SOUZA, 2008; COIMBRA, 1994).

No trabalho de Alves (2007), a autora realizou a prospecção fitoquímica do pó das cascas de *Aspidosperma subincanum* Mart, que foi positivo para esteróides,

triterpenóides, saponinas, taninos, alcalóides, cumarinas e resinas, porém foi negativo para flavonóides. Santos et al. (2009), revelaram em um estudo de prospecção fitoquímica do extrato etanólico das cascas do tronco da espécie *Aspidosperma subincanum*, alcalóides, saponinas, terpenóides, esteróides e taninos. Nóbrega (2009), relata a presença de triterpenos, esteroides, iridóides, saponinas, açucares redutores e ausência de glicosídeos cardíacos para *Aspidosperma pyriformium* Mart. No trabalho de Jácome et al. (2003), em que os autores fizeram prospecção fitoquímica do extrato etanólico das cascas de *Aspidosperma parvifolium*, foi revelada a presença de fenóis, flavonóides e ausência de saponinas.

A *A. parvifolium* é uma espécie encontrada principalmente no Estado de Minas Gerais, a *A. subincanum* é uma espécie nativa da Região Nordeste do Brasil e *A. pyriformium* é encontrada em áreas de caatinga, também no Nordeste brasileiro. Para os metabólitos secundários encontrados nas diferentes espécies de *Aspidospermas*, deve-se levar em consideração a variação não só entre espécies, as influências sazonais, o clima e solo de cada região em particular.

Tabela 3 Resultados da prospecção fitoquímica do EHEAe para diferentes classes de metabólitos secundários

CLASSES DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	RESULTADOS
Saponinas	+
Ácidos Orgânicos	-
Açúcares Redutores	+
Polissacarídeos	-
Fenóis e Taninos	+
Flavonóides	-
Alcalóides	+
Glicosídeos Cardíacos	-
Purinas	-
Catequinas	-
Naftoquinonas e Fenantraquinonas	-
Sesquiterpenolactonas	-
Depsídeos e Depsidonas	-
Derivados da Cumarina	-
Antraquinonas	-
Azulenos	-

Nota: (+) presença (-) ausência.

4.4 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DO EXTRATO HIDROETANÓLICO DAS CASCAS DE *A. EXCELSUM* E SUAS FRAÇÕES

Entre os eluentes testados na cromatografia em camada delgada (CCD), o que melhor separou as frações (exceto as alcalóidicas), foi a mistura composta de clorofórmio/acetato de etila/metanol/dietilamina (45,5:45,5:8:1). A **Figura 7** mostra o cromatograma do EHEAe, frações (hexânica, clorofórmica, acetato de etila e metanólica) e frações alcalóidicas. O cromatograma observado em luz UV ($\lambda = 254$ e 365 nm), mostra algumas manchas bem resolvidas.

Na observação em luz UV 254 nm, destacam-se duas manchas encontradas no EHEAe, fração clorofórmica, fração acetato de etila, fração metanólica, cujos fatores de retenção (R_f) foram: 0,25 e 0,4. A revelação com o Reativo de Dragendorff mostrou que as manchas observadas em $\lambda = 254$ nm e 365 nm são provavelmente alcalóides. As manchas foram encontradas nas mesmas frações observadas anteriormente e com os mesmos tempos de retenção. O sistema de eluição foi o mesmo utilizado por Tanaka et al., (2006; 2007), exceto pela utilização de trietilamina na fase móvel. Neste trabalho os autores utilizaram este sistema de eluição para realizar a separação de alcalóides de frações obtidas a partir de um extrato etanólico de *Aspidosperma ramiflorum*.

De acordo com Wagner e Bladt (2001), o $R_f=0,4$ é característico do alcalóide indólico ioimbina. Neste trabalho somente foi possível fazer a separação de alguns constituintes do EHEAe: frações clorofórmica, acetato de etila e metanólica. O mesmo não foi observado nas frações alcalóidicas (**Figura 8**).

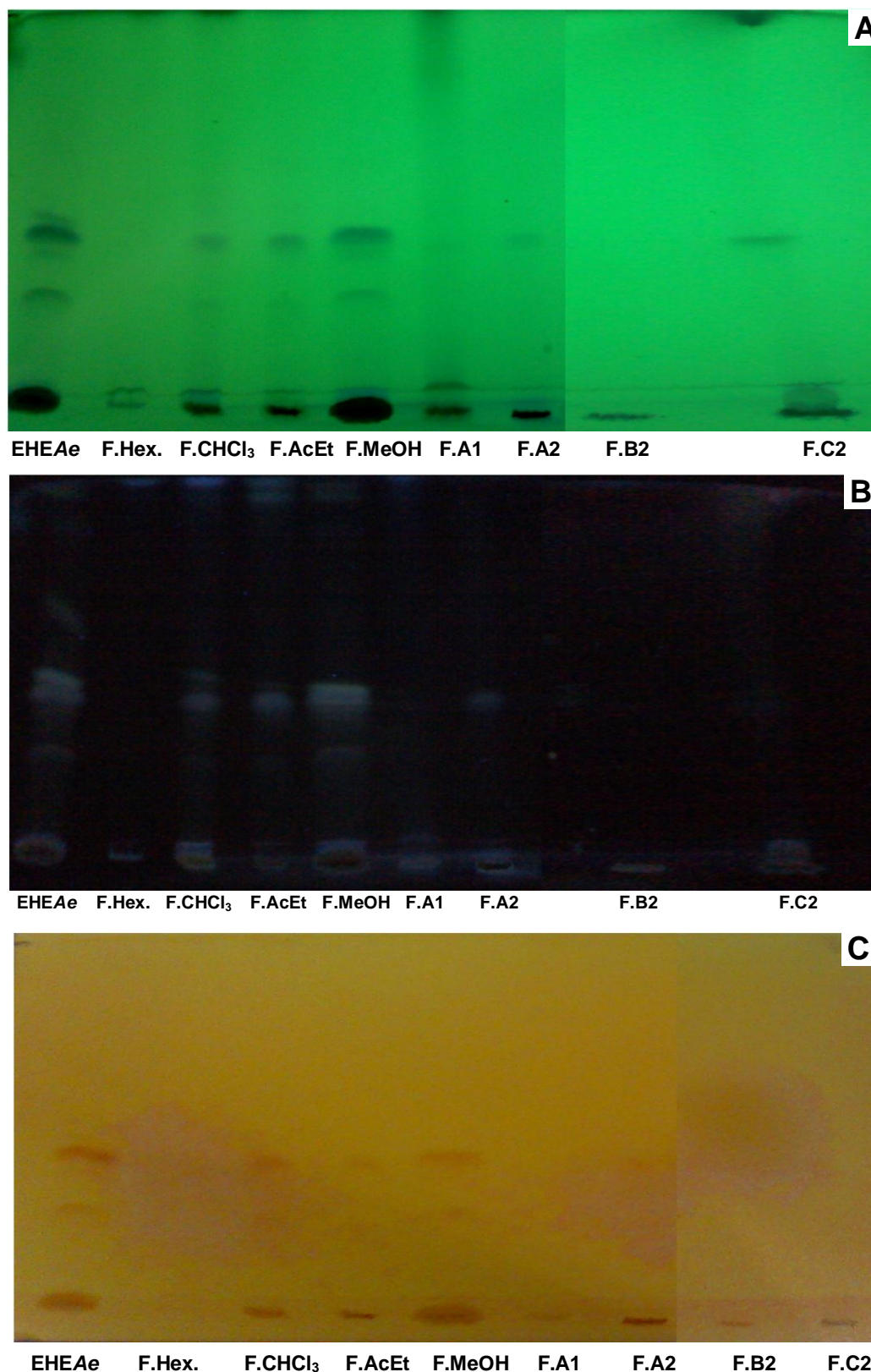


Figura 8: Cromatografia em camada delgada (CCD) do EHEAe e frações. (A) Cromatograma observado em $\lambda = 254\text{nm}$. (B) Cromatograma observado em $\lambda = 365\text{nm}$. (C) Cromatograma revelado com Reativo de Dragendorff ($R_f=0,25$ e $0,4$). **F.Hex.:** Fração hexânica; **F.CHCl₃:** Fração clorofórmica; **F.AcEt.:** Fração acetato de etila; **F.MeOH:** Fração metanólica; **F.A1:** Fração alcaloídica do pó das cascas de *A. excelsum* extraída com hexano; **F.A2:** Fração alcaloídica do pó das cascas de *A. excelsum* extraída com clorofórmio; **F.B2:** Fração alcaloídica da sol. aquosa de EHEAe extraída com clorofórmio; **F.C2:** Fração alcaloídica do EHEAe extraída com clorofórmio

Com a utilização da técnica de cromatografia preparativa, foi possível caracterizar o alcalóide indólico ioimbina. Foi observada a presença de um pico definido com tempo de retenção de 10,8 minutos. Esse cromatograma foi comparado com o cromatograma obtido do padrão de ioimbina P.A. (MERCK) que também foi submetida às mesmas condições cromatográficas mencionadas anteriormente (**Figura 9**). O perfil cromatográfico obtido pelo detector de arranjos de fotodiodos, mostra que ocorreu uma absorção máxima em 271 nm nas duas amostras, cujos perfis praticamente se sobreporam (**Figura 10**). Analisando os cromatogramas obtidos da amostra proveniente da cromatografia preparativa e do padrão de ioimbina P.A., ficou caracterizado que a substância obtida da CCD preparativa é o alcalóide indólico ioimbina, que, em função da maior intensidade do pico daquela amostra (EHEAe) nas condições analisadas, é o componente principal do EHEAe.

A caracterização do alcalóide indólico ioimbina neste trabalho, utilizando o pó das cascas de *A. excelsum*, corrobora com os achados de Relyveld, (1964), em que o autor conseguiu fazer o isolamento de metoxi-ioimbina, desta mesma espécie, assim como Burnell e Thi-Sen (1972), que isolaram a alfa-ioimbina.

A presença deste alcalóide indólico pode justificar o uso popular de espécies do gênero *Aspidosperma* no tratamento da disfunção erétil. Sperling et al., 2002, demonstraram que o extrato e frações da casca de arvores do gênero *Aspidosperma* conhecidas como *quebracho blanco*, foram capazes de inibir receptores α -2 adrenérgicos de tecidos penianos humanos. Campos et al. (2006), verificaram que uma fração rica em alcalóides indólicos de *Aspidosperma ulei*, produziu efeito pró-erétil em camundongos, entre os dois alcalóides encontrados em maior quantidade nas frações, uma era a ioimbina.

É atribuído aos alcalóides indólicos de espécies do gênero *Aspidosperma*, uma larga aplicação terapêutica (BOURDY et al. 2004). Este fato tem despertado nos pesquisadores, a necessidade de uma investigação mais apurada de uma correlação entre as atividades terapêuticas, com a grande ocorrência de alcalóides indólicos presentes no gênero *Aspidosperma*.

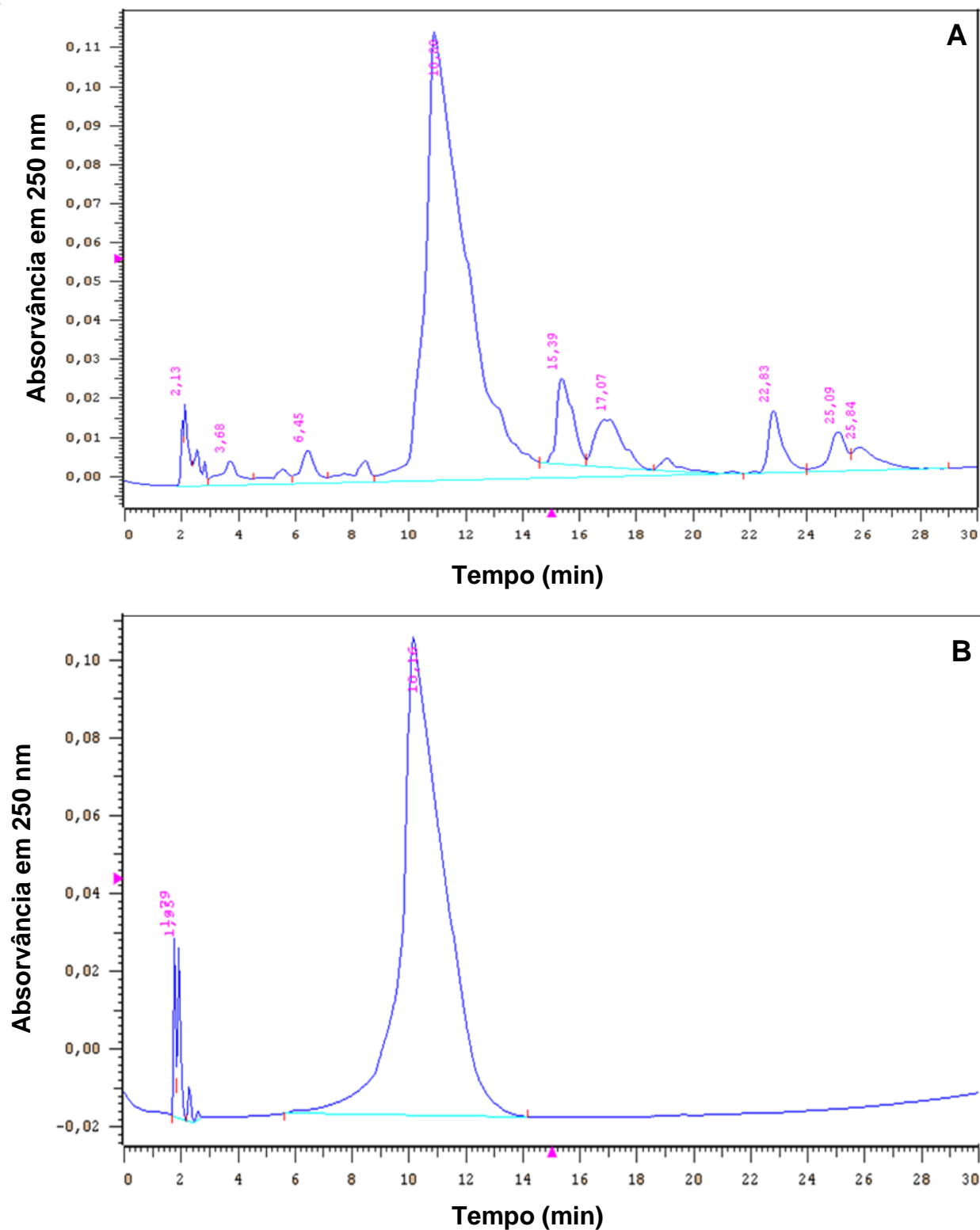


Figura 9: (A) Cromatograma da amostra retirada da cromatografia preparativa do EHEAe (B) Cromatograma do padrão de ioimbina P.A. Sistema de eluição: eluente A (H₂O, pH=3); eluente B (Acetonitrila): Fase móvel: A 90% - B 10% em 0 minutos; A 60% - B 40% em 30 minutos; A 10% - B 90% em 32 minutos. Fluxo: 0,8mL/min. Coluna Chromolith RP-18 (100 x 4,6 mm). Mesmas condições para ambas cromatografias.

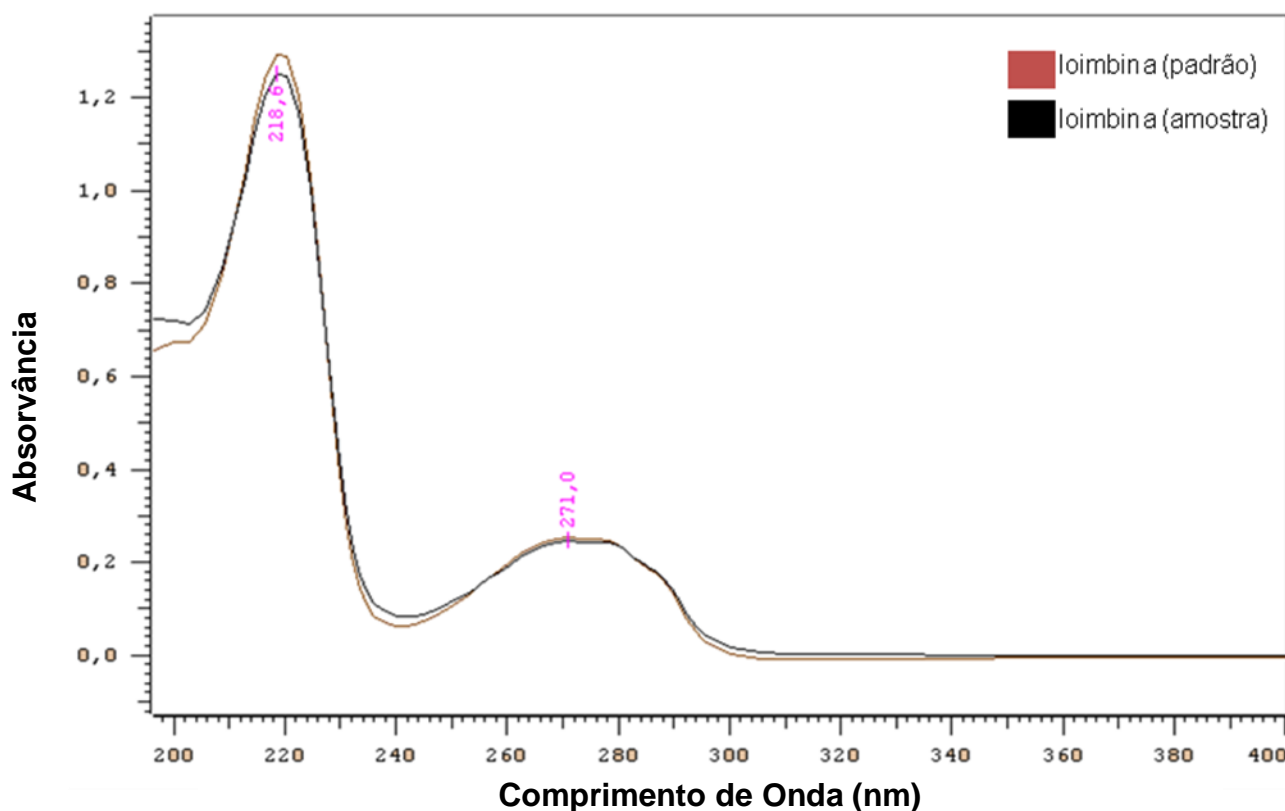


Figura 10: Espectro de UV da amostra proveniente da CCD preparativa e do padrão de ioimbina P.A.

Da *Aspidosperma quebracho blanco* já foram isolados e identificados cerca de 34 alcalóides (MARQUES, 1988), dentre os quais a aspidoespermina, um alcalóide indólico com atividade sobre uma linhagem de *Plasmodium falciparum* resistente a cloroquina (MITAINE-OFFER et al., 2002), e a ioimbina, que atua como bloqueador dos receptores α_2 -adrenérgicos e serotoninérgicos, provocando excitação central, elevação da pressão sanguínea, aumento da frequência cardíaca, da atividade motora e atividade antidiurética (DEUTSCH et al. 1994).

A *A. quebracho-blanco*, usada para tratamento de disenteria por indígenas do grupo étnico Isoceño-Guarani, no sudeste da Bolívia, também apresentou atividade antiplasmódica *in vitro* (BOURDY et al. 2004). Como já descrito anteriormente, esta espécie também é usada no tratamento da disfunção erétil (devido a fração contendo ioimbina) (SPERLING et al. 2002).

Alcalóides indólicos isolados de *Aspidosperma* spp., dentre eles N-formyl-aspidoespermidina e aspidoespermina, foram eficazes contra cepas de *P. falciparum*, depois de incubação de 72 horas (MITAINE-OFFER et al. 2002).

Um trabalho relativamente recente demonstrou que a elipticina e a aspidocarpina apresentaram maior atividade antiplasmódica *in vitro* que a quinina no clone K1 (*Plasmodium falciparum* multi-resistente, originário do Quênia) (ANDRADE-NETTO et al. 2007).

Dolabela (2007) avaliou a atividade antiplasmódica de extratos pertencentes ao gênero de *Aspidosperma*, através do método descrito por Rieckmann (1997), onde extratos obtidos de folhas, caules e cascas de *A. olivaceum* Muell. Arg., extratos de folhas de *A. ramiflorum* Mgf e de cascas de *A. spruceanum* Benth. Ex. Muell. Arg. mostraram-se ativos ($CI_{50} < 10 \mu\text{g/mL}$) no clone de *P. falciparum* W2 (resistente a cloroquina e sensível a mefloquina e quinina).

Os extratos obtidos de cascas e caules de *A. ramiflorum* Mgf, extratos de folhas e de caules de *A. spruceanum* Benth. Ex. Muell. Arg.; extrato do caule e folhas de *A. cylindrocarpon*, extratos de sementes, frutos, caules e folhas de *A. tomentosum* Mart. e extrato de cascas de *A. parvifolium* A.DC. apresentaram atividade antiplasmódica moderada (CI_{50} variando de 10 a 100 $\mu\text{g/mL}$) no clone de *P. falciparum* W2.

O extrato etanólico das cascas de *A. parvifolium* A.DC. foi submetido à extração ácido-base e as frações alcalóidicas resultantes também se mostraram ativas contra o clone W2 ($CI_{50} < 10 \mu\text{g/mL}$) (DOLABELA, 2007).

A *A. megalocarpon* foi avaliada quanto a sua atividade contra *P. falciparum* por Weninger et al. (2001) realizando testes *in vitro* com extrato diclorometânico e metanólico, obtendo-se bons resultados, com uma CI_{50} em 72 h de 25 $\mu\text{g/mL}$ para cepas F32 oriundas da Tanzânia e sensíveis a cloroquina e 8 $\mu\text{g/mL}$ em cepas D2 resistentes à cloroquina.

Mitaine-Offer et al. (2002) testaram três dos quatro alcalóides isolados desta espécie, aspidolimidina, aspidoalbina e fendlerina (MITAINE et al., 1998) demonstrando uma baixa atividade antimalárica com estes alcalóides purificados.

Mesquita et al. (2007) testaram, *in vitro*, contra uma linhagem de *P. falciparum* resistente a cloroquina e citotóxica contra células pulmonares embrionárias de humanos (MRC-5) e células retiradas dos músculos de ratos (L-6), os extratos hexânico e etanólico das folhas, madeira, casca do caule, raízes e cascas das raízes de *A. macrocarpon*. O melhor resultado foi obtido com o extrato etanólico das cascas das raízes contra o *P. falciparum*, mas não foram observados efeitos citotóxicos para nenhum dos extratos nas células ensaiadas.

4.5 ATIVIDADE ANTIPLASMÓDICA DO EXTRATO, FRAÇÃO ALCALOÍDICA (C2) E FRAÇÃO METANÓLICA

Os resultados da avaliação antiplasmódica *in vitro* em culturas de *P. falciparum* W2 com o EHEAe, fração alcaloídica (C2), fração metanólica e o controle positivo (quinina) estão apresentados na **Tabela 4**. Os melhores resultados obtidos foram com o EHEAe em 24h de incubação ($CI_{50} = 5,2 \pm 4,1 \mu\text{g/mL}$). Os demais tempos foram de $12 \pm 8,6 \mu\text{g/mL}$ e $16 \pm 12 \mu\text{g/mL}$, em 48 e 72 horas respectivamente (**Tabela 4**).

Para avaliação da atividade antiplasmódica, foi adotado o esquema proposto por Basco et al.(1994) modificado por Dolabela (2007) em que o extrato e frações foram classificados de acordo com a faixa de valores da CI_{50} : ATIVOS ($CI_{50} < 10,0 \mu\text{g/mL}$); MODERADAMENTE ATIVOS (CI_{50} entre 10,0 e 100,0 $\mu\text{g/mL}$); INATIVOS ($CI_{50} > 100,0 \mu\text{g/mL}$). A descrição quanto a atividade esta descrita na **Tabela 5**. Todas as amostras analisadas (extrato e frações) durante todo o tempo de incubação (até 72 horas) mostraram atividade antiplasmódica boa a moderada. Estes achados indicam que o EHEAe tem uma atividade esquizonticida rápida, ativo nas primeiras 24 horas.

Tabela 4: Concentração Inibitória média (CI_{50}) do EHEAe e frações alcaloídica (C2) e metanólica

AMOSTRAS	CI_{50} ($\mu\text{g/mL} \pm \text{D.P.M}$)		
	Tempo de incubação (horas)		
	24	48	72
EHEAe	$5,2 \pm 4,1$	$12,0 \pm 8,6$	$16,0 \pm 12,0$
Fração Alcaloídica (C2)	$37,2 \pm 4,2$	$11,0 \pm 1,4$	$30,0 \pm 12,0$
Fração Metanólica	$33,7 \pm 19,0$	$42,0 \pm 15,0$	$75,0 \pm 16,0$
Quinina (controle)	$0,04 \pm 0,02$	$0,014 \pm 0,01$	$0,008 \pm 0,003$

Tabela 5: Avaliação da atividade antiplasmodica de acordo com a CI_{50}

AMOSTRAS	TIPO DE ATIVIDADE *		
	Tempo de incubação (horas)		
	24	48	72
EHEAe	ATIVO	MODERADAMENTE ATIVO	MODERADAMENTE ATIVO
Fração Alcalóidica (C2)	MODERADAMENTE ATIVO	MODERADAMENTE ATIVO	MODERADAMENTE ATIVO
Fração Metanólica	MODERADAMENTE ATIVO	MODERADAMENTE ATIVO	MODERADAMENTE ATIVO

* de acordo com BASCO et al. 1994, modificado por DOLABELA, 2007.

Estes resultados sustentam a idéia do uso etnofarmacêutico da *A. excelsum* Benth (carapanaúba) como antimalárico (BRANDÃO et al. 1992). O levantamento etnofarmacêutico realizado no município de Igarapé Mirim (PA) entre outubro de 2000 e janeiro de 2001, revelou que a população local utiliza a casca de algumas espécies do gênero *Aspidosperma* dentre as quais *A. auriculatum*, para tratar malária e febres em geral (BARBOSA et al., 2003).

Mitaine-Offer et al. (2002) demonstram que atividade antiplasmodica da aspidospermina, alcalóide indólico isolado de *A. pyriformium*. e *A. megalocarpon* e foi estimada em 72 horas uma CI_{50} entre 3,2 e 15,6 $\mu\text{g/mL}$. Andrade-Neto et al. (2007), também mostraram atividade antiplasmodica *in vitro* de outra espécie de *Aspidosperma* em cepa K1 de *P. falciparum*. Aspidoscarpina, alcalóide indólico isolada da *A. desmanthun*, teve uma $CI_{50}=7\text{ng/mL}$ em cultura de *P. falciparum*.

Dolabela também confirmou a atividade antiplasmodica do extrato etanólico de *A. cylindrocarpon*, o qual apresentou atividade moderada (CI_{50} entre 10 a 100 $\mu\text{g/mL}$) para os clones W2 e 3d7. A autora também demonstrou que o extrato diclorometânico das cascas de *A. spruceanum*, rico em alcalóides, foi muito ativo em cepas W2 ($CI_{50}< 10 \mu\text{g/mL}$).

De espécies do gênero *Aspidosperma* já foram isolados cerca de 250 alcaloides indólicos (BOLZANI et al. 1987; JACOME, 1998; PEREIRA et al. 2007). Alcaloides indólicos são bastante ativos contra cepas de plasmódios e atuam de maneira similar aos alcaloides quinolínicos. Diversos autores tem atribuído, principalmente aos alcalóides, a atividade antiplasmodica *in vitro* e *in vivo*, tanto de extratos vegetais quanto das substâncias isoladas (KAUR et al, 2009).

4.6 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE DO EHEAe E DE SUA FRAÇÃO ALCALOÍDICA (C2)

Os resultados do ensaio de citotoxicidade, utilizando diferentes concentrações do EHEAe e de sua fração alcaloídica C2 (extraída com clorofórmio) estão representados na **Figura 10** e **Figura 11**, respectivamente.

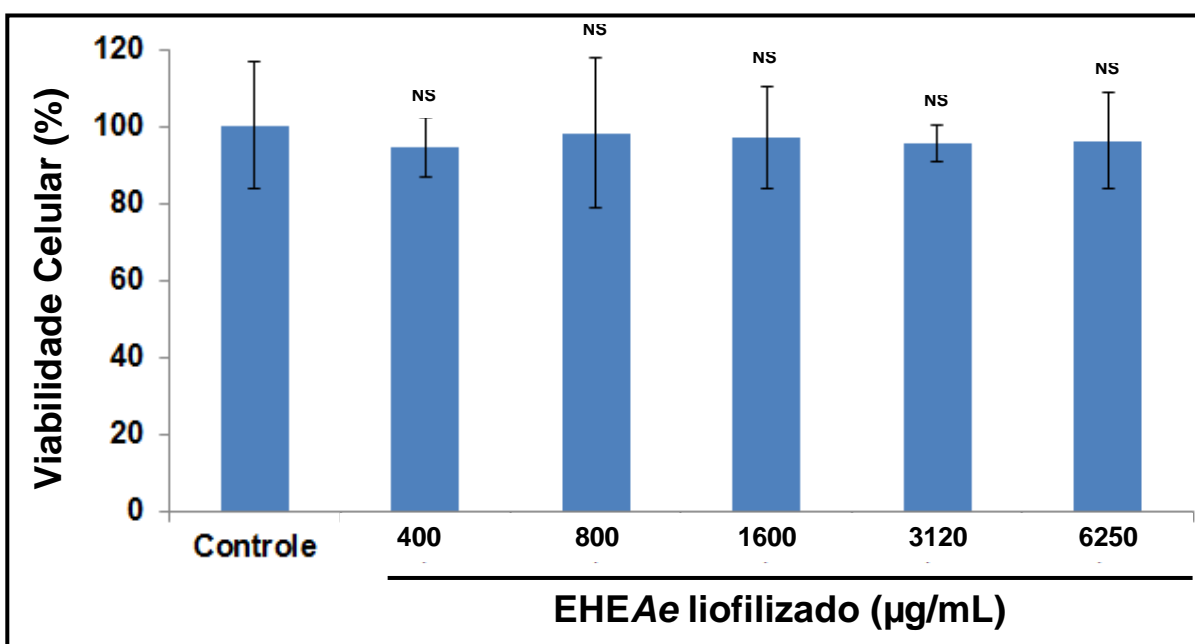


Figura 11. Efeitos de diferentes concentrações do EHEAe liofilizado sobre a viabilidade de células de fibroblastos L929 de camundongos. As colunas representam as médias \pm D.P de oito replicatas. ^{NS} Não significativo em relação ao controle para $p > 0,05$.

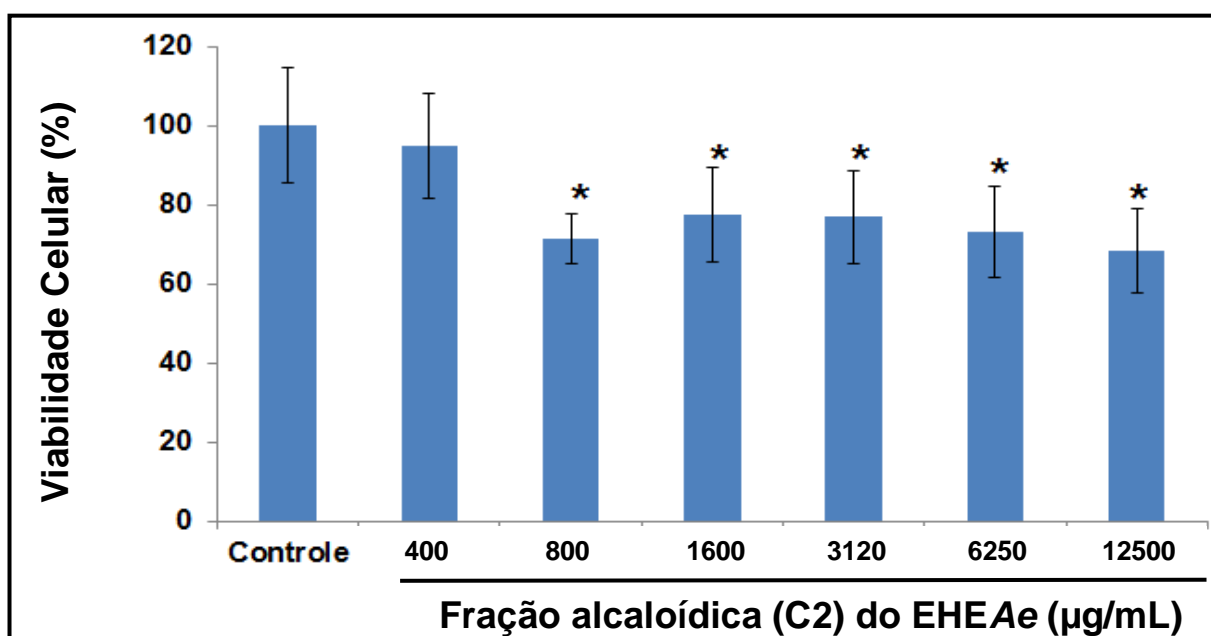


Figura 12. Efeitos de diferentes concentrações da fração alcaloídica (C2) do EHEAe sobre a viabilidade de células de fibroblastos L929 de camundongos. As colunas representam as médias \pm D.P de oito replicatas. * significativo em relação ao controle para $p > 0,05$

Neste trabalho, não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) na viabilidade celular de fibroblastos L929 incubados com diferentes concentrações de EHEAe liofilizado, indicando que este extrato não foi citotóxico para esta linhagem celular (**Figura 11**).

Já a fração alcaloídica **C2** do EHEAe, a qual foi extraída com clorofórmio, apresentou pequena citotoxicidade, com significativa redução da viabilidade celular ($p > 0,05$) nas concentrações superiores a 800 $\mu\text{g/mL}$. Os efeitos na redução da viabilidade celular não foram dependentes da concentração (**Figura 12**).

O estudo da citotoxicidade de um composto isolado ou um fitoterápico é utilizado na toxicidade como um parâmetro para se especular uma hipótese se tais substâncias serão tóxicas em modelos experimentais *in vivo*. Os testes de citotoxicidade são os primeiros ensaios para a avaliação da potencialidade de aplicação clínica de um novo produto. Experimentos celulares laboratoriais possibilitam reproduzir condições e até reações semelhantes às ocorridas no organismo podendo, dessa forma, observar e quantificar alterações sofridas pelas células frente a um determinado produto ou medicamento.

Kohn (2001), avaliou a atividade antiproliferativa *in vitro* dos extratos e frações de *Aspidosperma tomentosum* Mart., pelo método da sulforrodamina B, utilizando cinco linhagens tumorais humanas: K-562 (leucemia), MCF-7 (mama), NCI-ADR (mama), NCI-460 (pulmão) e UACC-62 (melanoma). O extrato etanólico inibiu de forma concentração-dependente o crescimento das linhagens MCF-7, UACC62, NCI-ADR e NCI-460, já o extrato diclorometânico apresentou uma maior atividade antiproliferativa nestas linhagens inclusive com efeito citotóxico sobre linhagem MCF-7, na concentração de 12 $\mu\text{g/mL}$.

A atividade citotóxica também foi observada no trabalho de Mitaine-Offer et al, (2002). A autora demonstrou que cinco alcaloides indólicos isolados de espécies de *Aspidosperma*, eram citotóxicos em linhagem celular NIH 3T3, fibroblastos humanos.

No trabalho de Dolabela (2007) foi demonstrado que o extrato etanólico de *Aspidosperma parvifolium*, baixa citotoxicidade em culturas de células VERO ($100 < \text{CC}_{50} < 500 \mu\text{g/mL}$)

Algumas espécies da família Apocynaceae do cerrado que são utilizadas na terapêutica tradicional. Dentre elas a *Aspidosperma macrocarpon* Mart. L, *A. tomentosum* Mart. L *Condylocarpon isthmicum* (Vell.) A. DC. *Hancornia pubescens* Nees Mart, *Himatanthus obovatus* (Mull. Arg.)Woodson e *Peschiera affinis* var.

campestris Rizzini, foram avaliadas em um estudo de citotoxicidade em células HCT-8 (carcinoma de cólon humano), HL-60 (leucemia), SF-295 (cérebro) e MDA-MB-435 (melanoma) (MESQUITA et al., 2009). Dos extratos testados somente a espécie *H. obovatus* (Mull. Arg.) Woodson teve atividade citotóxica nas culturas testada e as CC_{50} encontrados foram: 28,9 $\mu\text{g/mL}$ (SF-295); 28,8 $\mu\text{g/mL}$ (HCT-8); 27,65 $\mu\text{g/mL}$ (MDA-MB-435);: 40,4 $\mu\text{g/mL}$ (HL-60).

Lima et al. (2009), demonstraram que o extrato etanólico das folhas de *Aspidosperma pyrifolium*, foi capaz de ocasionar efeito hemolítico e também efeito tóxico em larvas de *Artemia salina*, ambas dependentes de concentração.

Extratos de *A. olivaceum* mostraram-se ativos em *P. falciparum*, e isto deve estar relacionado a presença dos alcaloides elipticina, aspidocarpina (ANDRADE-NETTO et al., 2007). A citotoxicidade da elipticina e da olivacina, agentes antitumorais, tem sido relatada em diferentes trabalhos científicos (MARINI et al., 1983; Le MEE et al., 1998).

A citotoxicidade basal reflete os efeitos adversos sobre as estruturas e processos da célula que são intrínsecas a todas as células, sendo assim a maioria dos sistemas celulares deveria mostrar uma resposta similar, além de responder de forma equivalente quando a toxicidade é medida por vários critérios de viabilidade (CASTAÑO e GÓMEZ-LECHÓN, 2005). Partindo desta premissa, ensaios de citotoxicidade basal *in vitro* foram propostos validados e empregados como uma importante ferramenta na redução do número de animais numa avaliação de toxicidade aguda sistêmica.

Embora existam soluções *in vitro*, dados como o efeito dos metabólitos das drogas investigadas não podem ser obtidos neste tipo de estudo, tal como aqui discutido. Por outro lado, a citotoxicidade basal é um ensaio que apresenta boa reprodutibilidade, de fácil execução, além de ser de baixo custo relativo (VALADARES, 2006). Existe, portanto, a necessidade de trabalhos que mostrem uma relação entre a citotoxicidade e toxicidade aguda (BOTHAN, 2003).

4.7 TOXICIDADE AGUDA ORAL

Um estudo envolvendo 33 laboratórios de 11 países (VAN DEN HEUVEL, 1990) avaliou o Procedimento Dose Fixa, do *Guideline* 420 (o mesmo procedimento empregado neste trabalho para avaliação da toxicidade aguda oral). Verificou-se que o procedimento Dose Fixa, apesar de usar muito menos animais do que o DL₅₀, produzia resultados compatíveis entre os diferentes laboratórios e provia informações adequadas sobre a toxicidade das substâncias, permitindo produzir categorias de toxicidade compatíveis com os fornecidos pelo método DL₅₀. O teste tornou-se um *Guideline* em 1992. As propriedades estatísticas do procedimento Dose Fixa foram avaliadas usando modelos matemáticos em vários estudos (STALLARD et al., 2002).

Segundo essa diretriz, vista em linhas gerais, a morte do animal não é uma meta. Observa-se cuidadosamente o aparecimento de sinais claros de toxicidade em uma de uma série de níveis de doses fixas. Os grupos de animais deverão receber doses em um processo gradual. A dose inicial é escolhida com base em um estudo piloto como uma dose presumivelmente capaz de produzir alguns sinais de toxicidade, sem provocar efeitos severos ou morte. Os grupos seguintes receberão doses maiores ou menores, a depender dos sinais de toxicidade observados anteriormente. O processo continua até que a dose capaz de causar toxicidade evidente ou não mais de uma morte é identificado, ou quando nenhum efeito é observado na dose mais alta ou quando a morte ocorre na dose mais baixa.

Neste trabalho foi adotado como a maior dose 5000 mg/kg (normalmente, a maior dose, prevista do *Guideline* da OECD é 2000 mg/kg). Entretanto, como não houve mortes ou aparecimento de sinais e sintomas de toxicidade, evidenciado pelo *screening* hipocrático e pela avaliação da evolução ponderal, consumo de água e ração e ainda pelos resultados anátomo e histopatológicos, não houve necessidade de administração de doses menores do extrato.

A triagem farmacológica e comportamental (avaliação ou *screening* hipocrático) foi realizada de acordo com avaliação proposta por Malone e Robichaud (1983) modificado por Brito (1994) (Anexo 2) que forneceu uma estimativa geral da natureza farmacológica e toxicológica do EHEAe liofilizado.

Durante o período das 4 horas que se seguiram à administração de 5000 mg/kg do EHEAe liofilizado, os animais tratados não demonstraram nenhum sinal de

toxicidade evidente e durante os 13 dias de experimento que se seguiram após administração v.o do EHEAe liofilizado.

A administração do EHEAe liofilizado na dose de 5000 mg/kg não alterou a evolução ponderal de ambos os sexos em relação aos respectivos grupos controle (**Tabela 6**).

Tabela 6 – Variação da evolução ponderal de camundongos (machos e fêmeas) tratados com dose única de 5000 mg/kg de EHEAe liofilizado e observados durante 14 dias.

TRATAMENTOS	VARIAÇÃO DE PESO (g)	
	Machos	Fêmeas
Controle	9,50 ± 0,85	9,00 ± 1,10
EHEAe (5000 mg/kg)	10,50 ± 0,87 ^{NS}	9,75 ± 1,00 ^{NS}

Os valores estão expressos em média ± desvio padrão (n=4).^{NS} Não significativo em relação ao controle para p > 0,05

O consumo médio de ração e água dos animais (machos e fêmeas) não foi alterado de forma significativa com a administração do EHEAe (p > 0,05) (**Tabela 7**)

Tabela 7 - Consumo de ração e água pelos camundongos (machos e fêmeas) tratados com dose única de 5000 mg/kg de EHEAe liofilizado e observados durante 14 dias.

TRATAMENTO	MACHOS	FÊMEAS
<u>Consumo médio de ração (g/dia)</u>		
Controle	8,5 ± 3,6	8,2 ± 2,7
EHEAe (5000 mg/kg)	6,7 ± 2,6 ^{NS}	8,7 ± 1,5 ^{NS}
<u>Consumo médio de água (mL/dia)</u>		
Controle	14,8 ± 4,8	14,0 ± 5,0
EHEAe (5000 mg/kg)	14,0 ± 3,8 ^{NS}	13,2 ± 4,0 ^{NS}

Os valores estão expressos em média ± desvio padrão (n=4).^{NS} Não significativo em relação ao controle para p > 0,05

Além do exame morfológico externo, foram analisados macro e microscopicamente o cérebro e cerebelo, estômago, intestinos, mesentério, o coração, pulmão, fígado e rins de todos os animais. Características da pele e pelos normais (cor, textura, densidade, espessura, comprimento dos pelos), sem sinal de alterações nos membros, orelhas, língua, dentes e olhos.

A anatomo-histopatologia constitui uma ferramenta valiosa para avaliação de

dano a um determinado órgão tanto ao nível macroscópico quanto microscópico (CULLING et al. 1985).

Do ponto de vista macroscópico, os órgãos não apresentaram quaisquer alterações anatômicas. Na avaliação microscópica, o coração e rins encontravam-se dentro dos limites da normalidade histológica. Não houve sinais de inflamação, necrose e alterações circulatórias no fígado. Os espaços portais, em geral pequenos e regularmente distribuídos, foram referencial para visualização da arquitetura histológica lobular do fígado. Nos animais controle, observou-se esteatose microvesicular discreta a leve, com pequenos vacúolos bem limitados e circunscritos no citoplasma dos hepatócitos. O processo predominou na região centrolobular e mediozonal do lóbulo hepático. Estas discretas alterações provavelmente são em decorrência de alguns fatores, como alimentação ou estresse (procedimentos de manipulação diários), com liberação de cortisol e adrenalina, mobilizando ácidos graxos e triglicerídeos, e não significam quaisquer sinais de toxicidade ou invalidam os controles. Ressalta-se que nos animais tratados com EHEAe não foi encontrada, ainda que discreta, a ocorrência de esteatose microvesicular.

O estudo histológico dos pulmões revelou arquitetura lobular parenquimatosa preservada, tendo os alvéolos paredes finas com revestimento epitelial habitual por pneumócitos. Não foi evidenciado a presença de corpos estranhos, processos inflamatórios agudo ou crônico ou sinais da presença de líquido no interior dos alvéolos. A matriz septal escassa e laxa, eventualmente comportava capilares congestos, sem haver, contudo, sinais de hemorragia recente ou antiga. Cérebro e cerebelo com estruturas celulares normais. Região do cárdia (estômago), com epitélio estratificado e porção glandular sem alterações na estrutura tecidual interior. Segmento do intestino delgado (íleo) estruturalmente normal. Presença discreta de gordura no mesentério. Finalmente, nenhum estigma de atipias celulares epiteliais ocorreu na amostra analisada.

Alves (2007) investigou a toxicidade de *Aspidosperma subincanum* Mart.. Na avaliação da toxicidade aguda, grupos de animais foram tratados com doses únicas deste extrato etanólico (500, 1000, 2000, 3000 e 5000mg/kg) e observados por 24 horas, não sendo observado qualquer sinal de toxicidade ou morte, e sugeriu que esta espécie é praticamente atóxica em exposição aguda a altas doses.

No estudo de toxicidade subcrônica, neste mesmo trabalho, grupos de ratos foram tratados durante 30 dias consecutivos com este extrato etanólico nas doses de 125, 250, 500 mg/kg. Os resultados demonstraram que durante o período de tratamento o extrato provocou poucas alterações bioquímicas, assim como não houve modificação no peso dos animais, porém na avaliação histopatológica houveram alterações celulares nos rins, pulmões e fígado em todas as doses avaliadas (ALVES, 2007).

Em suma, os resultados observados no exame anátomo e histopatológico não mostraram quaisquer sinais de toxicidade evidente com esta dose de EHEAe empregada (5000 mg/kg).

5. CONCLUSÕES

Tendo em vista os resultados obtidos, conclui-se que:

- ✓ A prospecção fitoquímica do EHEAe revelou a presença de saponinas, açúcares redutores, fenóis e taninos e alcalóides. Esta última classe de metabólitos também foi confirmada em quantidades significativas na fração alcaloídica básica extraída com clorofórmio (**C2**).
 - ✓ Através da cromatografia em camada delgada preparativa e cromatografia líquida de alta eficiência do EHEAe, foi caracterizada a presença o alcalóide indólico ioimbina.
 - ✓ EHEAe e frações (alcaloídica e metanólica) apresentaram atividade antiplasmódica *in vitro*. Entretanto, foi o extrato que apresentou melhor atividade nas primeiras 24 horas, indicando uma boa atividade esquizonticida.
 - ✓ Apenas a fração alcaloídica (**C2**) apresentou uma pequena, porém significativa citotoxicidade (para concentrações superiores a 800 µg/mL). O EHEAe não só não apresentou citotoxicidade como também nenhum sinal evidente de toxicidade aguda em camundongos na dose oral de 5000 mg/mL.
 - ✓ Os resultados obtidos neste trabalho indicam que, em função destas características, o EHEAe apresenta promissor potencial antimalárico, merecendo estudos mais detalhados sobre sua atividade antiplasmódica e composição química, com vistas no isolamento de compostos ativos e seu mecanismo de ação.
-

6. REFERÊNCIAS

<www.mobot.org> Acessado em 27 maio: 2010.

<www.tropicos.org> Acessado em: 27 maio: 2010

ABISCH, E.; REICHSTERIS, T. Oruebtuerebde Chemische Untersuchung einiger Apocynaceen. **Helv. Chim. Acta**, v. 53, p. 1844-1861, 1960.

AGRA, M.F.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 114-140, 2007.

AGRIPINO, D.G. et al. Screening of Brazilian plants for antimicrobial and DNA-damaging activities. I. Atlantic rain forest-Ecological station Juréia-Itatins. **Biota Neotropica**, v.4, n.2, 2004.

AJAIYEGBA et al. Antimalarial ethnobotany: *in vitro* antiplasmodial activity of seven plants identified in the Nigerian middle belt. **Pharm Biol.** v.42, p.588–59, 2005.

ALBUQUERQUE, B.W.P. Contribuição ao conhecimento das Aspidosperma da Amazônia Brasileira (Apocynaceae). **Acta Amazônica**, v. 1, n.3, p.9-20, 1971.

ALTMANN, K.H. Microtubule-stabilizing agents: a growing class of important anticancer drugs. **Curr Opin Chem Biol**, v.5, p. 424-431, 2001.

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

ALLORGE, L.; POUPAT, C. Position systématique et révision du genre *Aspidosperma* (Apocynaceae) pour les trios Guyanes. Le point sur leur chimie. **Letters Botaniques**, v.138, n.415, p.267-301, 1991.

ALTMANN, K.H. Microtubule-stabilizing agents: a growing class of important anticancer drugs. **Curr Opin Chem Biol**, v.5, p. 424-431, 2001.

ALVES, C.F. **Alcalóides quaternários da *Aspidosperma Polyneuron***. 1991. p. Dissertação (Mestrado-Área de concentração em Química Orgânica) - Departamento

ALVES, M. J. Q. F. Estudos pré-clínicos com plantas medicinais: base para a fitoterapia. In: FERRO, D. **Fitoterapia: conceitos clínicos**. São Paulo, Editora Atheneu, 2006.

ALVES, M. J. Q. F. Estudos pré-clínicos com plantas medicinais: base para a fitoterapia. In: FERRO, D. **Fitoterapia: conceitos clínicos**. São Paulo, Editora Atheneu, 2006.

ALVES, N.M. **Estudo farmacognóstico e da toxicidade experimental (Aguda e SubAguda) do Guatambú (*Aspidosperma subincanum Mart.*)**. Dissertação de Mestrado em Ciências da Saúde - Universidade de Brasília, Brasília, 2007. p. 43.

ANDRADE-NETO, V.F.; POHLIT, A.M.; PINTO, A.C.; SILVA, E.C.; NOGUEIRA, K.L.; MELO, M.R.; HENRIQUE, M.C.; AMORIM, R.C.; SILVA, L.F.; COSTA, M.R.; NUNOMURA, R.C.; NUNOMURA, S.M.; ALECRIM, W.D.; ALECRIM, M.G.; CHAVES, F.C. e VIEIRA, P.P. *In vitro* inhibition of *Plasmodium falciparum* by substances isolated from Amazonian antimalarial plants. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.102. n.3. p 359-66. 2007.

ASSEMI, M. Herbs Affecting the Central Nervous System: Ginkgo, Kava, St. John's Wort, and Valerian. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, v.44, n.4, p.824-835, 2001.

ASSIS, T. S.; MEDEIROS, R.M.T., ARAÚJO, J. A. S.; DANTAS, A.F.M.; RIET-CORREA, F. Intoxicações por plantas em ruminantes e equídeos no Sertão Paraibano. **Pesq. Vet. Bras.** v.29,3 n.11. p.919-924. 2009.

ASSIS, T.S.; MEDEIROS, R.M.T.; RIET-CORREA, F.; GALIZA, G.J.N.; DANTAS, A F.M.; OLIVEIRA, D.M. Intoxicações por plantas diagnosticadas em ruminantes e equinos e estimativa das perdas econômicas na Paraíba. **Pesq. Vet. Bras.** v.30, n.1, p.13-20, 2010.

BACHA, W.J.; WOOD, L.M. **Color atlas of veterinary histology**. Ed. Lea & Febiger. 269p. 1990.

BALANDRIN, M. F.; KLOCKE, J. A.; WURTELE, E. S.; BOLLINGER, W. H. Natural plant chemicals: sources of industrial and medicinal materials. **Science**, v. 228, n. 4704, p. 1154-1160, 1985.

BARBOSA, W. L. R. QUIGNARD, E. ; TAVARES, I.C.C. ; PINTO, I.N. ; OLIVEIRA, R.M. DE ; SANTOS, A.M. dos - **Manual para Análise Fitoquímica e Cromatográfica de Extratos Vegetais**. Disponível em: www.propesp.ufpa.br/revistaic/textos_cientificos.htm. Belém: UFPA, 2001. Site acessado em 09 de fevereiro de 2009.

BARBOSA, W.L.R.; TAVARES, J.C.C.; SOARES, D.C. Alcalóides de *Aspidosperma auriculatum* Standl. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.13 (supl), p.06-08, 2003.

BARROS, S.B.M., DAVINO, S.C. Avaliação da toxicidade. In: OGA, S. **Fundamentos de Toxicologia**. São Paulo: Atheneu, 1996. p. 61-70.

BASCO, L.K.; MITAKU, S.; SKALTSOUNIS, A.L.; RAVELOMANANTSOA, N.; TILLEQUIN, F.; KOCH, M.; LE BRAS, J. *In vitro* activities of furoquinoline and acridone alkaloids against *Plasmodium falciparum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.38, n.5, p. 1169-1171, 1994.

BERENDT, A. R.; TUMER, G. D.; NEWBOLD, C. I. Cerebral malaria: the sequestration hypothesis. **Parasitol Today**, v.10, n.10, p. 412-414, 1994.

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

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

BISSET, N. G. Arrow and dart poisons. **J Ethnopharmacol**, v. 25, n. 1, p. 1-41, 1989.

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

BOTHAM, P. A. Acute systemic toxicity. **ILAR JOURNAL**, v. 43, Suppl:S, p. 277-281, 2003.

BOTHAM, P.A. Acute systemic toxicity—prospects for tiered testing strategies. **Toxicology in vitro**. v.18, p. 227–230. 2004.

BOURDY, G.; CHAVEZ DE MICHEL, L. R.; ROCA-CULTHARD, A. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. Part VI. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by Isoceño-Guaraní Indians. **Journal of Ethnopharmacology**, v.93, p.269-277, 2004.

BRAGA, E.M. *Plasmodium* – Malária. In: NEVES, D.P. **Parasitologia Humana**. 11^a ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2005. p. 143.

BRANDÃO, M.G.L.; GRANDI,T.; ROCHA, E.; SAWER, D.; KRETTLI, A. Survey of medicinal plants used as antimalarials in the Amazon. **Journal of Ethnopharmacology**, v.36, p.175-82, 1992.

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

BURNELL, R. H.; THI-SEN, N. α -yohimbine from *aspidosperma excelsum*. **Phytochemistry**. v. 10, n. 4, p. 895. april. 1971.

CAMPOS A. R.; LIMA, R. C.P.JR.; UCHOA; D. E.A.; SILVEIRA, E. R.; SANTOS F. A.; RAO, V. S.N. Pro-erectile effects of an alkaloidal rich fraction from *Aspidosperma ulei* root bark in mice. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 104, p. 240-244. 2006.

CARMICHAEL, J; DEGRAFF, W.G.; GAZDAR, A.F.; MINNA, J.D; MITCHELL, J.B. Evaluation of a Tetrazolium-based Semi automated Colorimetric Assay: Assessment of Chemosensitivity Testing. **Cancer Research**, v. 47, p. 936-942, 1987.

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

CASTEEL, D.A. Antimalarial Agents. In: WOLFF, M.E. **Burger's Medicinal Chemistry and drug discovery**. 5 ed. Willey-Interscience Publication. v. 5, p. 4-90, 1997.

CASTAÑO, A.; GÓMEZ-LECHÓN, M.J.; Comparison of basal cytotoxicity data between mammalian and fish cell lines: A literature survey. **Toxicology in Vitro** v. 19, n.5, p. 695-705, 2005.

COIMBRA, R. **Manual de fitoterapia**. Belém: CESUP, v.1. 1994

CORDELL, G. A. **Introduction to alkaloids: A biogenetic approach**. John Wiley & Sons, New York, 1981.1055 p.

CORRÊA, M.P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Imprensa Nacional, Rio de Janeiro. 1931.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D J. Plants as a source of anti-cancer agents. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 100, n. 1 – 2. p. 72 – 79. aug. 2005..

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

DANESHVAR, C.; DAVIS, T.M.; COX-SINGH, J.; RAFA'EE, M.Z.; ZAKARIA S.K.; DIVIS, P.C.; SINGH, B. Clinical and laboratory features of human Plasmodium knowlesi infection. **Clin Infect Dis**. v.15, n.49(6), p.852-60. 2009

DA SILVA, D.M.; RIET-CORREA, F.; MEDEIROS, R.M.T.; OLIVEIRA, O.F.; Plantas tóxicas para ruminantes e eqüídeos no Seridó Ocidental e Oriental do Rio Grande do Norte. **Pesq. Vet. Bras**. v.26, n.4, p. 223-236, 2006. de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

DEHARO, E.; GARCIA, R.N.; OPRTO, P.; GIMENEZ, A.; SAUVIN, M.; JULIAN, V.; GINSBURG; H. A nonradio-abelled ferriprotoporphyrin IX biomineralization inhibition test for the high throughput screening of antimalarial compounds. **Exp Parasitol**. v.100, p.252–256. 2002.

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

DESJARDINS, R.E.; CANFIELD, C.J.; HAYNES, J.D.; CHULAY, J.D.. Quantitative assessment of antimalarial activity *in vitro* by a semiautomated microdilution technique. **Antimicrob Agents Chemother**. v.16, p.710–718. 1979

DEUTSCH, H.F.; et al. Isolation and biological activity of aspidospermine and quebrachamine from an Aspidosperma tree source. **Journal Pharmacology and Biomedical Analysis**, v.12, p.1283-7, 1994.

DI STASI, L.C. Asteridae medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica. In: DI STASI, L.C.; HIRUMA-LIMA, C.A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2º ed. São Paulo: Editora UNESP, p.372-93. 2002

DOLABELA, M.F. **Atividade antiplasmódica e citotoxicidade de *E. febrifuga* (A.St.Hill.)Juss. Ex. Mart. (Rutaceae) e espécies de *Aspidosperma* Mart.(Apocynaceae).**Tese de Doutorado. Faculdade de Farmácia, UFMG, 154p., 2007.

ETKIN, N. L.; EATON, J. W. Malaria-induced erythrocyte oxidant sensitivity. In: BREWER, G. J. **Erythrocyte structure and function.** New York, A. R. Liss, 1975. p. 219.

FAIRBAIRN, D.W.; OLIVE P.L.; O'NEILL K.L. The comet assay: a comprehensive review. **Mutat Res.** Feb;339(1):37-59. 1995.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4ª ed. 1988.

FARNSWORTH, N. R.; AKERELE, O.; BINGEL, A. S.; SOEJARTO, D. D.; GUO, Z. Medicinal plants in therapy. **Bull World Health Organ**, v. 63, n. 6, p. 965-981, 1985.

FERREIRA FILHO, J.M. et al. Four heptacyclic alkaloids from *Aspidosperma* species. **Journal Chemical Society C-Orgânic**, v.14, p.1260-6, 1966.

FERREIRA, D.T. et al. Avaliação da atividade antifúngica dos extratos etanólicos de raiz, caule e folhas de *Aspidosperma polyneuron*. In: ENCONTRO DE QUÍMICA DA REGIÃO SUL, 11., 2003. Pelotas

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

FIDOCK, D.A.; ROSENTHAL, P.J.; CROFT, S.L.; BRUN, R.; NWAKA, S. Antimalarial drug discovery: efficacy models for compound screening. **Nature Rev Drug Discovery**. v. 3, p.509–520, 2004.

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

GILANI, S. A.; KIKUCHI, A.; SHINWARI, Z. K.; KHATTAK, Z. I.; WATANABE, K. N. Phytochemical, pharmacological and ethnobotanical studies of *Rhazya stricta* Decne. **Phytother. Res.**, v. 21, p. 301–307, 2007.

GILBERT, B. Um estudo fitoquímico do gênero *Aspidosperma*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.38, p.315-9, 1966.

GOLONI, R. et al. Estudo da toxicidade aguda do *Aspidosperma subincanum* MARTIUS. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.2, n.2, p.89-91, 2005.

GRAEBNER, I. B. **Estudo dos constituintes químicos isolados de plantas medicinais da região do Vale do Purus no Acre (Amazônia)**. 2003. 134 f. Tese (Doutorado em Química – Área de Química Orgânica) – Setor de Ciências Naturais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2003.

HENRIQUE, M.C. **Estudo químico e atividade biológica das cascas de *Aspidosperma desmanthum* e *A. vargasii* (Apocynaceae)**. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-graduação em Química, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2007, 241p.

International standard: **Biological Evaluation of Medical Devices** – Part 5: Tests for Cytotoxicity: *in vitro* methods. ISO 10993-5, 1992.

JÁCOME, R.L.R.P.; SOUZA, R.A.; OLIVEIRA, A.B. Rev. Bras. Farmacogn. Comparação cromatográfica entre o extrato de *Aspidosperma parvifolium* e o fitoterápico "Pau-Pereira". **Rev. Bras. Farmacogn.** v. 13, p. 39 – 41. 2003.

JOHNSTON, B. A. Major diversity loss: 1 in 8 plants in global study threatened. **HerbalGram**, v. 43, n. 54, 1998.

JOLY, A.B. **Botânica**: introdução à taxonomia vegetal. 10ª ed. São Paulo: Editora Nacional, 1991. v.4, 777p.

KAUR, K.D.; JAIN, M.; KAUR, T.; MARCH, R. J. Bioorganic & Medicinal Chemistry **Antimalarials from nature**. v.17, p. 3229–3256, 2009

KLAASSEN, C.D. Princípios de toxicologia e tratamento do envenenamento. In: GOODMAN & GILMAN. **As bases farmacológicas da terapêutica**. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 11º ed. 2006.

KOBAYASHI, J; SEKIGUCHI, M.; SHIMAMOTO, S.; SHIGEMORI, H.; ISHIYAMA, H.; OHSAKI, A. Subincanadines A-C, novel quaternary indole alkaloids from *Aspidosperma subincanum*. **Journal of Organic Chemistry**, v.67, n.18, p.6449-55, 2002.

KOHN, L.K. **Atividade antiproliferativa do Extrato Bruto e das Frações de *Aspidosperma tomentosum* Mart.** Dissertação de Mestrado em Clínica Médica. Universidade Estadual de Campinas, 2001.

KUMAR, S. Free heme toxicity and its detoxification systems in human. **Toxicol. Lett.** v.157, n.3, p.175-188, 2005.

KUTALEK, R.; PRINZ, A. **African medicinal plants**. Haworth Medical Press: New York, 97-124. 2005;

LARINI, L. L. Avaliação Toxicológica. In: LARINI, L. **Toxicologia**. 3 ed. Editora Manole. São Paulo, p.43-58, 1997.

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

LIMA, C.M.B.L. **Avaliação da toxicidade aguda e crônica do extrato hidroacoólico das folhas de *Cissus sicyoides* L.** Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos da Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa. 2007. 108p.

LIMA, M. C. J. S.; SOTO BLANCO, B. Poisoning in goats by *Aspidosperma pyrifolium* Mart.: Biological and cytotoxic effects. **Toxicon**. v. 55, p. 320–324. 2010

LINDOSO, J.A.L.; LINDOSO, A.A.B.P. Neglected tropical diseases in Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 51, n. 5, p. 247-253, 2009.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 2ª ed. São Paulo: Instituto Plantarum, 1998. 352p..

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

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

MARQUES, M.F.S. et al. Indole alkaloid from *Aspidosperma ramiflorum*. **Phytochemistry**, v.41, n.3, p.963-7, 1996.

MEDEIROS, R.M.T.; NETO, S.A.G.; RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L.; SOUSA, N.L. Mortalidade embrionária e abortos em caprinos causados por *Aspidosperma pyrifolium*. **Pesq. Vet. Bras**. v.24, p.42–43, 2004

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

MESQUITA, M.L. et al. In vitro antiplasmodial activity of Brazilian cerrado plants used as traditional remedies. **Journal of Ethnopharmacology**, v.110, p.165-70, 2007.

MILLIKEN, W. Traditional anti-malarial medicine in Roraima, Brazil. **Econ. Botany**, v. 51, p. 212-237, 1997.

MINISTÉRIO DA SAUDE, BRASIL. Malária 2008. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=21400>.

MINISTERIO DA SAUDE. *Situação epidemiológica da malária no Brasil, 2008*. Brasília, 2008.

MITAINE-OFFER, A.C.; SAUVAIN, M.; VALENTIN, A.; CALLAPA, J.; MALLIE, M.; ZECHES-HANROT, M.. Antiplasmodial activity of *Aspidosperma* indole alkaloids. **Phytomedicine**, v.9(2), p.142-145, 2002.

MOSMANN, T. Rapid colorimetry assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

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

NÓBREGA, M.G.L.A. **Perfil fitoquímico e farmacológico da *Aspidosperma pyrifolium* mart. “ensaios pré-clínicos”**. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas - Universidade federal de Pernambuco, Recife, 2008. p. 13.

OECD Guidelines 401, 420, 423 and 425. **Up-and-Down Procedure Peer Panel Report**. p. 1 – 12. mar.1999.

OECD. OECD Guideline for Testing of Chemicals, No 420: **Acute Oral Toxicity-Fixed Dose Method**. Paris:Organisation for Economic Co-operation and Development, 1992.

OGA, S. **Fundamentos da Toxicologia**. São Paulo: Atheneu, 1996. 515 p.

OLIVEIRA, A.B.; DOLABELA, M. F.; BRAGA, F.O. C.; JÁCOME, R. L.R.P.; VAROTTI, F. P.; PÓVOA, M. M. Plant-derived antimalarial agents: new leads and efficient phythomedicines.Part I. Alkaloids. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**. v.81, n.4, p.715-740, 2009.

OLIVEIRA, A. J. B.; SILVA, C.C. ; TANAKA, J.C.A. ; DIAS FILHO, B.P.; NAKAMURA, C.V. Atividade antibacteriana do extrato bruto e frações de *Aspidosperma ramiflorum*. In: 28 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2005, Poços de Caldas - MG. **Livro de Resumos da 28 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2005.

OLIVEIRA, A.J.B. et al. Callus culture of *Aspidosperma ramiflorum* Muell. Arg.: growth and alkaloid production. **Acta Scientiarum**, v.23, p.609-12, 2002.

OLIVEIRA, F.Q. et al. Potencial das plantas medicinais como fonte de novos antimaláricos: espécies indicadas na bibliografia etnomédica brasileira. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.5, n.2, p.23-31, 2003.

OLIVEIRA, V.B.; FREITAS, M.S.M; MATHIAS, L.; BRAZ-FILHO, R.; VIEIRA, L.J.C. Atividade biológica e alcalóides indólicos do gênero *Aspidosperma* (Apocynacea): uma revisão. **Rev. Bras. Pl. Med.** v.11, n.1, p.92-99, 2009.

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

ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD 407. **Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents**. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, 1995.

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

ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). **Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method**. OECD guideline for testing of chemicals, nº 423. Adopted: 17th December 2001.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). **Guidance document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation**. OECD *guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing*.2000.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). **Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents**. OECD guideline for testing of chemicals, nº 407. Adopted: 27th July 1995.

PEREIRA, M.M. et al. Alcalóides indólicos isolados de espécies do gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae). **Química Nova**. v.30, n.4, p.970-83. 2007.

PEREIRA, M.M. SOUZA JÚNIOR, S.N.2, ALCÂNTARA, A.F.C.2; PILÓ-VELOSO, D.2; ALVES, R.B.2; MACHADO, P.O.2; AZEVEDO, A.O.3; MOREIRA, F.H.; CASTRO, M.S.A.; RASLAN, D.S Constituintes químicos e estudo biológico de *Aspidosperma nitidum* (Apocynaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.8, n.3, p.1- 8, 2006a.

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

PINTO, A.C.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S.; LOPES, N.P.; EPIFÂNIO, R.A.; Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Quim Nova**, v.25, p.45-61, 2002.

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

RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v.39, p.603-13, 2001.

RATHORE, D.; JANI, D.; NAGARKATTI, R.; KUMAR, S. Heme detoxification and antimalarial drugs – Known mechanisms and future prospects. **Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies**. v.3, p.153–158. 2006.

RELYVELD, P. Isolation of methoxy-yohimbine from *Aspidosperma excelsum* Benth. **Pharm Weekbl. Dutch**. v. 28, n 99., p. 921 – 922. aug. 1964.

RIECKMAN, K.H.; SAX, L.J.; CAMPBELL, G.H.; MRENA, J.F. Drug sensitivity of *Plasmodium falciparum*. An *in vitro* microtechnique. **Lancet**, v.i, p.22-23, 1997.

ROGERO, S. O.; LUGAO, A. B.; IKEDA, T. I.; CRUZ, A. S. Teste *in vitro* de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, v. 6, n. 3, p. 317-320, 2003.

SANCHEZ, B.A.M.; VAROTTI, F.P.; RODRIGUES, F.G.; CARVALHO, L.H. Validation of a *Plasmodium falciparum* parasite transformed with green fluorescent protein for antimalarial drug screening. **J Microbiological Methods**. v.20, p.1–5. 2007.

SANTOS, S.R.; RANGEL, E.T.; LIMA, J.C.; SILVA, R.M.; LOPES, L.; NOLDIN, V.F.; CECHINEL FILHO, V.; DELLE MONACHE, F.; MARTINS, D.T. Toxicological and phytochemical studies of *Aspidosperma subincanum* Mart. stem bark (Guatambu). **Pharmazie**. v. 64, n 12, p. 836 – 839. dec. 2009.

SAXENA, S; PANT, N.; JAIN, D.C.; BHAKUNI, R.S. Antimalarial agents from plant sources. **Current Sci**, v. 85, p.1314-1329, 2003.

SCHRISPSEMA, J; DAGNINA, D.; GROSMAN, G. Alcalóides indólicos. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Organizadores: Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Grasman, G.; Mello, J.C.P.; Ments, L.A.; Petrovick, P.R. Ed. Da UFSC e UFRCS, capítulo 31, p. 679-706, 1999.

SCHULTES, R. E.; HOFMANN, A.; RÈATSCH, C. **Plants of the gods : their sacred, healing, and hallucinogenic powers**. Healing Arts Press: Rochester, Vt., 2001; 208 p.

SILVA, D. M.; RIET-CORREA, F.; MEDEIROS, R.M.T.; OLIVEIRA, O. F. Plantas tóxicas para ruminantes e eqüídeos no Seridó Ocidental e Oriental do Rio Grande do Norte. **Pesq. Vet. Bras.** v 26, n 4., p. 223-236, dez. 2006

SIXEL, P.J.; PECINALLI, N.R. Características farmacológicas gerais das plantas medicinais. **Infarma**, v.16, p.13-14, 2005.

SOUZA, A.C.M. et al. Propriedades antifúngicas dos alcalóides de *Aspidosperma ramiflorum*. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA. 29.,2006. Águas de Lindóia. **Resumo**. São Paulo, 2006.

SPERLING, H.; LORENZ, A.; KREGG, S.; ARNDT, R.; MICHEL, M. C. An extract from the bark of *Aspidosperma quebracho blanco*, binds to human penile α_2 adrenoceptors. **The Journal of Urology**. v. 168, p. 160 – 163. july. 2002

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

STEELE, J.C.P.; VEITCH, N.C.; KIT, G.C.; SIMMONDS, M.S.J.; WARHURST D.C. Indole and β -caboline alkaloids from *Geissospermum sericeum*. **J Nat Prod**. v.65, p.85–88. 2002.

STITZEL, K.;CARR, G. Statistical Basis for Estimating Acute Oral Toxicity Comparison of OECD Guidelines 401, 420, 423 and 425. **Up-and-Down Procedure Peer Panel Report**. p. 1 – 12. mar. 1999.

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

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

TANAKA, J.C.A.; DA SILVA, C.C.; DE OLIVEIRA, A.J.B.; NAKAMURA, C.V.; DIAS FILHO, B.P. Antibacterial activity of indole alkaloids from *Aspidosperma ramiflorum*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 39, p. 387 – 391. 2006

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

TRATADO DE COOPERACIÓN AMAZONICA (TCA). **Plantas medicinales Amazónicas**: realidad y perspectivas. Ediciones TCA. Lima: Ediciones TCA, 1995. p.

TUROLLA, M. S. R.; NASCIMENTO, E. S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n.2, p.289-306, 2006. UNICAMP. 1994. 122p.

TUROLLA, M.S.R.; NASCIMENTO, E.S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v.42, n.2, p.199-306, 2006.

VALADARES, M. C. Avaliação de toxicidade aguda: estratégias após a “Era do Teste DL₅₀”. **Revista Eletronica de Farmácia**, v. 3, n. 2, p. 93-98, 2006.

VAN DEN BERG, M. A. Ver-o-peso: the ethnobotany of an Amazo-Amazonian market. In: PRANCE, G. T.; KALLUNK, J. A. **Advances in economic botany. Ethnobotany in the Neo Tropics**, New York Botanical Garden, New York, p. 140-149, 1984.

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

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

VEIGA, V.F.J.; ANGELO, C. P. Plantas medicinais: Cura segura? **Química nova**, v.28, p. 519-528, 2005.

VERPOORTE, R.; PUIGROK, C.L.M.; BERARHEIM, S A. Medicinal plants of Surinam. II- Antimicrobial active alkaloids from *Aspidosperma marcgravianum*. **Planta Medica**, v.46, p.149-52, 1982..

WAGNER, H; BLADT, S. **Plant Drug Analysis**: a thin layer chromatography atlas. . 2ª edição. Springer. 2001. 24 p.

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

WHO - World Health Organization. **World Malaria Report 2010** (Geneva, Switzerland). Disponível em: <http://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2010/en/index.html>. Acessado em: 29/03/2011.

WOODSON, J. R. E.. Studies in the Apocynaceae VIII. An interim revision of the genus *Aspidosperma* Mart. & Zucc. **Ann. Missouri Bot. Gard.** v.38, n.2, p.119–206. 1951.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). 10 facts on neglected tropical diseases. Disponível em: <http://www.who.int/features/factfiles/neglected_tropical_diseases/ntd_facts/en/index.html>. Acesso em: 04 nov. 2010.

WRIGHT C.W. Traditional antimalarial and the development of novel antimalarial drugs. **J Ethnopharmacol** 100: 67–71. 2005.

WRIGHT, C.W.; ADDAE-KYEREME, J.; BREEN, A.G.; BROWN, J.E.; COX, M.F.; CROFT, S.L.; GOK, E.K.Y.; KENDRICK, H.; PHILLIPS, R.M.; POLLET, P.L.

Synthesis and evaluation of cryptolepine analogues for their potential as new antimalarial agents. **J Med Chem.** v.44, p.3187–3194. 2001

WHITE, N.J. Plasmodium knowlesi: the fifth human malaria parasite. **Clin Infect Dis.** v.15, n. 46, p.172-3. 2008.

Anexos



Parecer de Aprovação Nº 041/2009/CEPAN/IEC/SVS/MS
Registro CEPAN - Nº 0058/2009

Ananindeua/PA, 16 de setembro de 2009.

Projeto: “**Abordagem fitoquímica, determinação da atividade antiplasmódica *in vitro* e avaliação toxicológica (estresse oxidativo e toxicidade aguda e subcrônica) da Carapanaúba (*Aspidosperma excelsum Benth*)**”.


Pesquisador Responsável: FLÁVIO DE VASCONCELOS

Conforme decisão do Comitê de Ética em Pesquisa com Animais-CEPAN do Instituto Evandro Chagas, cientificamos que o projeto acima **foi aprovado**.

Recomendamos ao coordenador responsável que mantenha atualizados todos os documentos pertinentes ao projeto.

Os relatórios parciais deverão ser encaminhados a este Comitê, anualmente, a partir do início do projeto.

Atenciosamente,


NELSON ANTONIO BAILÃO RIBEIRO
Coordenador do CEPAN/IEC

