



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

**ESTUDOS FARMACOGNÓSTICOS, FITOQUÍMICOS E
ATIVIDADE ANTILEISHMANIA DE ESPÉCIES
Geissospermum (Apocynaceae)**

João Victor da Silva e Silva

Belém-PA
2016

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

**ESTUDOS FARMACOGNÓSTICOS, FITOQUÍMICOS E
ATIVIDADE ANTILEISHMANIA DE ESPÉCIES
Geissospermum (Apocynaceae)**

Autor: João Victor da Silva e Silva

Orientadora: Profa. Dra. Maria Fani Dolabela

Co-orientador: Prof. Dr. Andrey Moacir do Rosario Marinho

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

Belém-PA

2016

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

Silva, João Victor da Silva e.

Estudos farmacognósticos, fitoquímicos e atividade antileishmania de espécies *Geissospermum* (Apocynaceae) / João Victor da Silva e Silva; orientadora, Maria Fâni Dolabela, co-orientador, Andrey Moacir do Rosário Marinho. — 2016.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Belém, 2016.

1. Leishmaniose. 2. Química orgânica (Fitoquímica). 3. Plantas medicinais. 4. *G. vellosii*. 5. *G. sericeum*. I. Título.

CDD: 22. ed. : 616.9364

FOLHA DE APROVAÇÃO

João Victor da Silva e Silva

ESTUDOS FARMACOGNÓSTICOS, FITOQUÍMICOS E ATIVIDADE ANTILEISHMANIA DE ESPÉCIES *Geissospermum* (Apocynaceae)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará como requisito final para obtenção do Título de mestre em Ciências Farmacêuticas.


Área de concentração: Fármacos e Medicamentos.

Aprovado em: 07/11/2016.

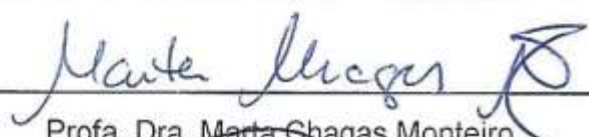
Banca Examinadora



Prof. Dra. Maria Fâni Dolabela (Orientadora)
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas UFPA



Prof. Dr. Andrey Moacir do Rosario Marinho (Co-orientador)
Instituto de Ciências Exatas e Naturais/UFPA



Prof. Dra. Marta Chagas Monteiro
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas UFPA



Prof. Livre-Docente Sandro Percário
Instituto de Ciências Biológicas/UFPA

Belém-PA

2016

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Terezinha Soares da Silva e Sebastião Siqueira da Silva que são a base de tudo em minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus, Jesus Cristo, por me dá capacidade e se fazer presente em todos os momentos de minha vida.

À meu alicerce, mãe e pai, que me possibilitaram mesmo na simplicidade de suas condições vê na educação uma ferramenta de transformação e esperança.

À toda minha família que apesar da distancia se fizeram presentes em todos os momentos. Fica aqui meus mais sinceros agradecimentos as minhas irmãs Dayana, Danila e Idalina e ao meu irmão João Paulo. Também não posso deixar de agradecer ao meu tio Waldemar e tias Raimunda e Deuza por abriram a porta de suas casas e suas vidas.

À minha companheira, pelo carinho de todos os dias, pela cumplicidade, momentos de alegrias e principalmente pelas histórias que estamos escrevendo diariamente juntos... meu muito obrigado a “estrelinha”, Romênia de Freitas.

Hoje é mais um desses dias que olho para trás e vejo quanto já cresci pelas oportunidades que minha orientadora me proporcionou. Agradeço por me tornar melhor que ontem e querer ser melhor amanhã, muito obrigado professora Maria Fâni Dolabela.

Ao professor Andrey Marinho, pela co-orientação desse trabalho e por todos os momentos que sempre esteve disposto a ajudar.

Aos professores que contribuíram com esse trabalho: Fernando Tobias, Lílian Lund, Márlia Coelho, Marta Chagas, José Otávio, Roseane Costa, Sandro Percário.

Ao Grupo PET-Farmácia e aos alunos de iniciação científica pela oportunidade de aprender diariamente a capacidade de orientar, obrigado em especial ao Airton Moraes, Alexandre Rosa, Analu Damasceno, Ana Laura, Fernanda Melo, Laisy Trindade, Lara Vinhal, Lindalva Ferreira, Jhéssica Peniche, Juliana Corrêa, Juliana Silvestre, Luiz Antônio, Natasha Cristina e Tatiane Costa.

À todos os discentes do PPGCF, agradeço a Andreza Silva (à orientadora), Dayse Brandão (a queridinha), Érica Patrícia (a conterrânea), Érica Vanessa (a namoradinha), Heliton Patrick (o “zerado”), Kelly Albuquerque (a mãezona), Mírian Bastos (a senhorita TOC, viciada em cafeína), Milena Martins (a leitora), Rosana Monteiro (a Rosana IML), Rosana Sarmiento (a mellitus), Valdicley Vale (o ex-

Padawan). Também quero agradecer aos discentes Everton Varela, Kalene Oliveira, Rafael Quadros, Rafaelli Gomes e Taylon Aguiar por toda ajuda prestada.

Aos discentes do laboratório de Química: André, Érica, José Wander e Luciano (PPGQ UFPA); laboratório de toxicologia: Johnatan Azevedo e Lucas Gallat; Museu Paraense Emílio Goeldi: Rafaela Cabral.

Ao Jorge Dores Rissino (“seu Jorge”, Laboratório de Citogenética do Instituto de Ciências Biológicas) e ao Raimundo Nonato da Silva Barbosa (“seu Nonato”, Laboratório de Parasitologia do Instituto Evandro Chagas), pessoas que foram fundamentais para o desenvolvimento desse trabalho. Fica aqui meu muito obrigado!

RESUMO

SILVA-SILVA, J. V. **ESTUDOS FARMACOGNÓSTICOS, FITOQUÍMICOS E ATIVIDADE ANTILEISHMANIA DE ESPÉCIES *Geissospermum* (Apocynaceae)**. 141 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Belém, 2016.

O objetivo deste trabalho foi realizar estudos farmacognósticos, fitoquímicos, atividade antileishmania e citotoxicidade de *Geissospermum vellosii* Allemão e *Geissospermum sericeum* Miers. Os estudos farmacognósticos foram realizados de acordo com a Farmacopeia Brasileira, V ed. (2010). Os extratos (EEGV e EEGS) foram obtidos através da maceração exaustiva com etanol (96° GL), seguido de concentração em rotaevaporador. O extrato etanólico foi fracionado por dois métodos: extração sob refluxo (frações de diferentes polaridades) e partição ácido-base (fração de neutro e fração alcaloídica). As frações alcaloídicas (FAGV e FAGS) foram fracionadas em coluna cromatográfica contendo gel de Sephadex LH-20, e as subfrações resultantes foram analisadas em CCD e reveladas com reagente de Dragendorff e ultravioleta (365 nm). As subfrações F6FAGV e F6FAGS, onde se detectou alcaloides e bom rendimento, foram submetidas a novos fracionamentos em CLAE-DAD semipreparativa e a métodos espectrofotométricos. Na avaliação antileishmania utilizou-se formas promastigotas da espécie de *Leishmania amazonensis* (5×10^6 parasitas/100 μ L) tratada com diferentes concentrações das amostras por 24, 48 e 72h. A análise foi feita adicionando-se brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] (MTT) em leitor de ELISA, em 490nm. A citotoxicidade foi avaliada através do ensaio de viabilidade celular com o MTT em células THP-1 diferenciadas e HepG2. Como critério de seleção foi utilizado o cálculo do índice de seletividade (IS), descrito como a razão entre a concentração citotóxica 50% em linhagens celulares e a Concentração inibitória 50% encontrado para protozoários, considerando-se pormissores valores ≥ 10 . Os pós das plantas foram classificados como grosso (*G. vellosii*) e muito grosso (*G. sericeum*), de baixa densidade, com pH de 4,94 (*G. vellosii*) e 6,47 (*G. sericeum*), negativos para saponinas, com teor de cinzas e umidade dentro dos parâmetros estabelecidos pela Farmacopeia Brasileira, V ed. O estudo fitoquímico levou ao isolamento de um alcaloide indólico (F3F6FAGV) e um β -carbolínico (flavopereirina) de ambas as espécies. O fracionamento de EEGV e EEGS resultou em subfrações mais citotóxicas, porém o tempo de exposição e o refracionamento reduziram esta toxicidade. Na avaliação antripromastigota todas as amostras foram ativas e o fracionamento aumentou a atividade. A flavopereirina apresentou atividade tempo dependente e superior a anfotericina B. Entretanto, a associação da flavopereirina com alcaloide indólico e/ou a anfotericina B reduziu a seletividade desse metabólito. O fracionamento dos extratos contribui para elevação do índice de seletividade, sendo a seletividade da flavopereirina elevada (IS= 4893,3). Logo, o isolamento da flavopereirina contribui para redução da citotoxicidade e aumento da seletividade, caracterizando-se como um agente antileishmania promissor.

Palavras-chave: Leishmaniose, química orgânica (fitoquímica), plantas medicinais, *G. vellosii*, *G. sericeum*.

ABSTRACT

SILVA-SILVA, J. V. **PHARMACOGNOSTIC AND PHYTOCHEMICAL STUDIES, AND ANTILEISHMANIAL ACTIVITY OF *Geissospermum* SPECIES (APOCYNACEAE)**. 2016. 141 p. Dissertation (Master's degree) - Graduate Degree Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Pará, Belém, 2016.

This study aimed to perform pharmacognostic and phytochemical studies, and assess antileishmanial activity and cytotoxicity of *Geissospermum vellosii* Allemão and *Geissospermum sericeum* Miers. The pharmacognostic study was carried out as described in the Brazilian Pharmacopoeia, 2010. The ethanol extracts (GVEE and GSEE) were obtained by exhaustive maceration with ethanol (96 ° GL), followed by concentration in rotaevaporator. The ethanol extract was fractionated using two methods: extraction under reflux (fractions of different polarities) and acid-base partition (neutral and alkaloid fractions). The alkaloid fractions (GVAF and GSAF) were fractionated on a chromatographic column with Sephadex LH-20 gel, and the resulting subfractions were analyzed on TLC, and revealed through Dragendorff reagent and ultraviolet (365 nm). The F6GVAF and F6GSAF subfractions, with alkaloids detected and good yield, were subjected to semi-preparative HPLC-DAD, and spectrophotometric methods. For evaluating the antileishmanial activity, promastigote forms of *Leishmania amazonensis* at a concentration of 5×10^6 parasites/100 μ L were treated with the samples at different concentrations for 24, 48 and 72h. The analysis was done adding [3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) to the samples in an ELISA reader at 490 nm. Cytotoxicity was assessed through cell viability assay with MTT in differentiated THP-1 cells and HepG2. As a selection criteria, the selectivity index (SI) was calculated as the ratio between the cytotoxic concentration 50% in cell lines, and the inhibitory concentration 50% found for protozoa, considering as promising values ≥ 10 . The plant powder was classified as thick (*G. vellosii*), and very thick (*G. sericeum*), low density, with pH 4.94 (*G. vellosii*) and 6.47 (*G. sericeum*), negative to saponins, with ash and moisture within the parameters established by the Brazilian Pharmacopoeia V. In the phytochemical study, we suggest the isolation of an indole alkaloid (F3F6FAGV) and a β -carboline (flavopereirine) from both species. The fractionation of GVEE and GSEE resulted in more cytotoxic subfractions, but the exposure time and refractionation reduced this effect. In the antipromastigote assay, all samples were active, and the fractionation increased the activity. The flavopereirine presented time-dependent activity greater than amphotericin B. However, the flavopereirine in association with indole alkaloid and/or amphotericin B reduced the selectivity of this metabolite. The extracts fractionation increases the selectivity index, and the selectivity of flavopereirine is high (SI = 4893.3). Therefore, the isolation of flavopereirine contributes to reduce cytotoxicity and increase selectivity, showing itself as a promising antileishmanial agent.

Keywords: Leishmaniasis, organic chemistry (phytochemical), medicinal plants, *G. vellosii*, *G. sericeum*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Cerâmica pré-Inca indicando lesões causadoras de deformações cutâneas na face em caso de leishmaniose	23
Figura 2:	Ciclo biológico da <i>Leishmania</i> spp.	25
Figura 3:	Principais medicamentos usados para tratamento de leishmaniose	26
Figura 4:	Fracionamento sob refluxo dos extratos etanólicos de cascas de <i>G. vellosii</i> e <i>G. sericeum</i>	60
Figura 5:	Partição ácido-base dos extratos etanólicos de <i>G. vellosii</i> e <i>G. sericeum</i>	61
Figura 6:	Modelo esquemático das placas de 96 poços de fundo chato e da distribuição das substâncias testadas que estão representadas por cores	66
Figura 7:	Redução do MTT por enzimas mitocondriais	69
Figura 8:	Esquema do trabalho desenvolvido neste estudo	71
Figura 9:	Aspecto físico do pó obtido das cascas de <i>G. vellosii</i> (A) e <i>G. sericeum</i> (B)	73
Figura 10:	Análise cromatográfica em camada delgada do extrato etanólico e frações de <i>G. vellosii</i> e <i>G. sericeum</i> , reveladas em UV (365nm) e reagente dragendorff	78
Figura 11:	Análise cromatográfica em camada delgada das subfrações de <i>G. vellosii</i> e <i>G. sericeum</i> , reveladas em UV (365nm) e reagente dragendorff	81
Figura 12:	Análise em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao Detector de Arranjos de Diodos (CLAE-DAD) das subfrações de <i>G. vellosii</i> e <i>G. sericeum</i>	82
Figura 13:	Análise em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência semipreparativa (CLAE-DAD semiprep.) das subfrações de <i>G. vellosii</i> e <i>G. sericeum</i>	84
Figura 14:	Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ¹³ C da substância F3F6FAGV obtida a partir da Subfração F6FAGV	86

das cascas de *G. vellosii* – 300 MHz, CD₃OD

- Figura 15:** Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ¹³C da 87 substância F3F6FAGS obtida a partir da Subfração F6FAGS das cascas de *G. sericeum*– 300 MHz, CD₃OD
- Figura 16:** Espectro de ressonância magnética nuclear de ¹H da 88 substância F3F6FAGV obtida a partir da Subfração F6FAGV das cascas de *G. vellosii* – 300 MHz, CD₃OD
- Figura 17:** Espectro de ressonância magnética nuclear de ¹H da 89 substância F3F6FAGS obtida a partir da Subfração F6FAGS das cascas de *G. vellosii* – 300 MHz, CD₃OD
- Figura 18:** Sugestão de estruturas químicas das substâncias F3F6FAGV 91 e F3F6FAGS (estrutura 1) e F4F6FAGV e F7F6FAGS (estrutura 2)
- Figura 19:** Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ¹H da 92 substância F4F6FAGV obtida das cacas de *G. vellosii* – 300 MHz, CD₃OD
- Figura 20:** Espectro de massa de íon totais no modo positivo de 95 ionização da substância F3F6FAGV obtida das cascas de *G. vellosii*
- Figura 21:** Espectro de Massa de íon totais no modo positivo de 96 ionização da substância F3F6FAGS obtida das cascas de *G. vellosii*
- Figura 22:** Espectro de Massa de íons filhos no modo positivo de 97 ionização da subfração F3F6FAGV obtida das cascas de *G. vellosii*
- Figura 23:** Espectro de Massa de íon totais no modo positivo de 98 ionização da substância F4F6FAGV obtida das cascas de *G. vellosii*
- Figura 24:** Espectro de Massa de íons filhos no modo positivo de 99 ionização da substância F4F6FAGV obtida das cascas de *G. vellosii*
- Figura 25:** Curva de crescimento das formas promastigotas de *L. (L.)* 101 *amazonsensis*

- Figura 26:** Atividade antipromastigota do extrato etanólico e frações 105 obtidos das cascas de *G. vellosii* contra *L. amazonensis*
- Figura 27:** Atividade antipromastigota do extrato etanólico e frações 108 obtidos da casca de *G. sericeum* contra *L. amazonensis*

LISTA DE QUADROS

Quadro 1:	Metabólitos isolados a partir do gênero <i>Geissospermum</i>	32
Quadro 2:	Avaliação biológica do gênero <i>Geissospermum</i>	35
Quadro 3:	Enquadramento taxonômico de <i>Geissospermum vellosii</i>	38
Quadro 4:	Metabólitos isolados de <i>Geissospermum vellosii</i>	40
Quadro 5:	Avaliação biológica de <i>Geissospermum vellosii</i>	45
Quadro 6:	Avaliação biológica de <i>Geissospermum sericeum</i>	48
Quadro 7:	Designação da cepa de <i>Leishmania</i> utilizada no estudo	56
Quadro 8:	Interpretação dos resultados da avaliação antipromastigota	67
Quadro 9:	Interpretação dos resultados da citotoxicidade	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Atividade antiplasmódica <i>in vitro</i> e citotoxicidade de alcaloides obtidos de <i>G. sericeum</i>	49
Tabela 2:	Massa das amostras obtidas de <i>G. vellosii</i> e <i>G. sericeum</i>	61
Tabela 3:	Rendimentos das subfrações de <i>G. vellosii</i> e <i>G. sericeum</i> obtidas por coluna de Sephadex	62
Tabela 4:	Sistema de eluição empregado nas análises por CLAE-DAD	63
Tabela 5:	Sistema de eluição empregado nas análises por CLAE-DAD semipreparativa	63
Tabela 6:	Análise granulométrica das cascas de <i>G. vellosii</i> e <i>G. sericeum</i>	73
Tabela 7	Análise farmacognóstica do pó das cascas de <i>G. vellosii</i> e <i>G. sericeum</i>	76
Tabela 8:	Rendimento e cromatografia em camada delgada de <i>G. vellosii</i> e <i>G. sericeum</i>	78
Tabela 9:	Rendimentos e análise cromatográfica das subfrações obtidas da fração alcaloídica de <i>G. vellosii</i> por coluna de Sephadex	80
Tabela 10:	Rendimentos e análise cromatográfica das subfrações obtidas da fração alcaloídica de <i>G. sericeum</i> por coluna de Sephadex	80
Tabela 11:	Rendimento das subfrações obtidas por CLAE-DAD semipreparativa	83
Tabela 12:	Dados das atribuições dos sinais de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C da substância F3F6FAGV de <i>G. vellosii</i>	90
Tabela 13:	Dados das atribuições dos sinais de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H da substância F4F6FA de <i>G. vellosii</i>	93
Tabela 14:	Avaliação antipromastigota do extrato e frações de <i>G. vellosii</i>	104
Tabela 15:	Avaliação antipromastigota do extrato e frações de <i>G. sericeum</i>	107
Tabela 16:	Análise comparativa da avaliação antipromastigota entre as espécies <i>G. vellosii</i> e <i>G. sericeum</i>	109
Tabela 17:	Avaliação da citotoxicidade de <i>G. vellosii</i>	111
Tabela 18:	Avaliação da citotoxicidade de <i>G. sericeum</i> .	112

Tabela 19:	Análise comparativa em diferentes tempos de avaliação	115
Tabela 20:	Avaliação citotóxica e inibitória do extrato e frações de <i>G. sericeum</i>	117
Tabela 21:	Avaliação citotóxica e inibitória das substâncias isoladas	118
Tabela 22:	Avaliação citotóxica e inibitória das substâncias em associação	119
Tabela 23:	Avaliação da ação inibitórias das diferentes associações	121

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ATP	Adenosina Trifosfato
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CBM	Concentração Bactericida Mínima
°C	Graus Celsius
µL	Microlitro
µM	Micromolar
µm	Micrometros
AcOEt	Acetato de Etila
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CD ₃ OD	Metanol deuterado
CI ₅₀	Concentração Inibitória mínima 50%
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - Detector de Arranjos de Diodos
cm	Centímetro
DCM	Diclorometano
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio Padrão
EEGV	Extrato etanólico de <i>Geissospermum vellosii</i>
FAGV	Fração de alcaloides de <i>Geissospermum vellosii</i>
F6FAGV	Fração 6 do fracionamento em coluna de sephadex LH-20 da fração de alcaloides de <i>Geissospermum vellosii</i>
EEGS	Extrato etanólico de <i>Geissospermum sericeum</i>
FAGS	Fração de alcaloides de <i>Geissospermum sericeum</i>
F6FAGS	Fração 6 do fracionamento em coluna de sephadex LH-20 da fração de alcaloides de <i>Geissospermum sericeum</i>
FrHexGV	Fração Hexânica de <i>Geissospermum vellosii</i>
FrDCMGV	Fração Diclorometânica de <i>Geissospermum vellosii</i>
FrAcOETGV	Fração Acetato de Etila de <i>Geissospermum vellosii</i>
FrMeOHGV	Fração Metanólica de <i>Geissospermum vellosii</i>

FrHexGS	Fração Hexânica de <i>Geissospermum sericeum</i>
FrDCMGS	Fração Diclorometânica de <i>Geissospermum sericeum</i>
FrAcOETGS	Fração Acetato de Etila de <i>Geissospermum sericeum</i>
FrMeOHGS	Fração Metanólia de <i>Geissospermum sericeum</i>
L	Litro
LC-MS	Cromatografia Líquida acoplada a Espectro de Massa
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
MeOH	Metanol
mg	Micrograma
min.	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
MRSA	<i>S. aureus</i> Oxacilina Resistente
NF-kB	Fator de transcrição - kappa B
Nm	Nanometro
OMS/WHO	Organização Mundial de Saúde/ World Health Organization
p/v	Peso/volume
pH	Potencial hidrogenionico
Rf	Fator de Retenção
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
rpm	Rotação por minuto
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute 1640
SBF	Soro Bovino Fetal
SI	Sistema Internacional de Unidades
Tr	Tempo de Retenção
TQD	Detecção Triplo Quadrupolo
UV	Ultravioleta
v/v	volume/volume
Vis	Visível
W2	Cepa de <i>Plasmodium falcipararum</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1	Leishmaniose	22
2.2	Família Apocynaceae	28
2.2.1	GENERO <i>Geissospermum</i>	30
2.2.1.1	<i>Geissospermum vellosii</i> Allemão	37
2.2.1.2	<i>Geissospermum sericeum</i> Miers	46
3	OBJETIVOS	50
3.1	Objetivo geral	50
3.2	Objetivos específicos	50
4	MATERIAL E MÉTODOS	51
4.1	Material	51
4.1.1	EQUIPAMENTOS	51
4.1.2	SOLVENTES	52
4.1.3	FASES ESTACIONÁRIAS	52
4.1.4	MATERIAIS PLÁSTICOS, DE METAL E DE VIDRO	52
4.1.5	VIDRARIAS	53
4.1.6	MEIO DE CULTURA E OUTROS	54
4.1.7	REVELADORES PARA CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)	55
4.1.7.1	Reagente dragendorff	55
4.1.8	PREPARO DOS MEIOS DE CULTIVO	55
4.1.8.1	Meio RPMI 1640 (com L-Glutamina e sem Bicarbonato de sódio) incompleto e meio completo	55
4.1.9	MATERIAL BIOLÓGICO	56
4.1.9.1	Espécie de <i>Leishmania</i>	56
4.1.9.2	Linhagem Celular	56
4.1.10	MATERIAL VEGETAL	56
4.2	Métodos	57
4.2.1	ESTUDO FARMACOGNÓSTICO	57

4.2.1.1	Análise granulométrica	57
4.2.1.2	Determinação da densidade bruta	57
4.2.1.3	Determinação da perda por dessecação (teor de água)	58
4.2.1.4	Determinação do teor de cinzas totais	58
4.2.1.5	Determinação do pH	58
4.2.1.6	Índice de espuma	59
4.2.2	ESTUDOS FITOQUÍMICOS	59
4.2.2.1	Caracterização dos extratos e frações	62
4.2.3	AVALIAÇÃO BIOLÓGICA	64
4.2.3.1	Atividade antileishmania	64
4.2.3.1.1	<i>Cultivo e manutenção das formas promastigotas de Leishmania</i>	64
4.2.3.1.2	<i>Ensaio da Atividade Antipromastigota</i>	65
4.2.3.1.3	<i>Conversão dos monócitos em macrófagos</i>	67
4.2.3.1.4	<i>Cultivo e manutenção das linhagens celulares</i>	68
4.2.3.1.5	<i>Ensaio de viabilidade celular (método MTT)</i>	68
4.2.3.1.6	<i>Índice de Seletividade (IS)</i>	70
4.2.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	70
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	72
5.1	Farmacognóstico	72
5.2	Fitoquímico	76
5.3	Atividade Biológica	100
6	CONCLUSÃO	122
	REFERÊNCIAS	123

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças infectoparasitárias, causadas por várias espécies de protozoários do gênero *Leishmania* (ROSS, 1903). É considerada a segunda parasitose mais preocupante do mundo, com cerca de 98 países acometidos pelas diferentes formas clínicas (BRASIL, 2010a; WHO, 2015).

A forma cutânea (ou tegumentar) ocorre em 82 países, com cerca de 0,7 a 1,3 milhões de novos casos notificados ao ano (WHO, 2010, 2015). No Brasil, anualmente são notificados em torno de 21.089 casos de leishmaniose tegumentar (BRASIL, 2014). Portanto, esta doença merece atenção nos cenários mundial e brasileiro, devido à sua alta incidência e ao risco de causar deformidades com conseqüente envolvimento psicológico (BRASIL, 2007), gerando reflexos no campo social e econômico (BRASIL, 2010a; SKRABA et al. 2014). Além disso, existem inúmeras limitações na quimioterapia, tais como efeitos tóxicos dos fármacos, baixa eficácia dos tratamentos alternativos (ROCHA, 2009), alto custo, difícil administração, tempo prolongado do tratamento e resistência parasitária (CROFT e COOMBS, 2003; RATH et al. 2003). Estas limitações contribuem para interrupção ou abandono da quimioterapia pelo paciente antes de seu término (DEMICHELI e FRÉZARD, 2005).

Diante desse cenário, torna-se necessário estudos que visem o isolamento e a caracterização de compostos ativos para leishmaniose, mais eficazes e menos tóxicos em relação aos fármacos convencionais (BEZERRA, 2006). No entanto, uma estratégia pouco explorada para novos fármacos leishmanicidas é a avaliação da atividade das plantas utilizadas na medicina popular para o tratamento de feridas de difícil cicatrização.

Nesta busca, estudos avaliaram a atividade antileishmania contra formas promastigotas de *L. amazonensis*, em extratos hidroalcoólicos de diferentes espécies. Os extratos das espécies *Julocroton triqueter* (Lam.) Didr. var. *triqueter* (Euphorbiaceae), *Dichorisandra* sp (Commelinaceae) e *Tephrosia cinerea* (L.) Pers. (Fabaceae) apresentaram maior eficácia (CI₅₀= 29,5; 32,9 e 43,6 µg/mL, respectivamente). *Passiflora edulis* Sims (Passifloraceae), *Chenopodium ambrosioides* L. (Chenopodiaceae) e *Syzygium jambolanum* DC. (Myrtaceae)

apresentaram eficácia moderada (CI_{50} = 150,1; 151,9 e 166,6 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente). *Pedilanthus tithymaloides* (L.) Poit (Euphorbiaceae) e *Orbignya phalerata* Mart. (Arecaceae) apresentaram baixo efeito leishmanicida (CI_{50} > 500 $\mu\text{g/mL}$), enquanto *Peristrophe angustifolia* e *Cecropia* sp. não apresentaram efeito. Dessa forma, dos dez extratos testados, três apresentaram uma expressiva atividade leishmanicida *in vitro* (BEZERRA et al. 2006).

Apesar dos resultados promissores de Bezerra et al. (2006), a maioria das espécies utilizadas na medicina popular para o tratamento de feridas carecem de estudos. Na Amazônia, diferentes plantas são utilizadas para o tratamento de feridas de difícil cicatrização, destacando-se a família Apocynaceae. Esta família pode ser considerada uma das mais importantes fontes de compostos químicos úteis para a medicina (DI STASI e HIRUMA LIMA, 2002), entre eles, os alcaloides (PEREIRA et al. 2007). Alguns estudos vêm demonstrando que alcaloides indólicos e bisindólicos possuem atividade antiparasitária (MITAINE-OFFER et al. 2002; OSORIO; MONTOYA; ARANGO, 2006). Além disso, entre as 10 espécies mais importantes da Amazônia, em termos medicinais, encontram-se as do gênero *Geissospermum* (Apocynaceae), *Geissospermum vellosii* (PECKOLT, 1942) e a *Geissospermum sericeum* (OLIVEIRA et al. 2003).

Geissospermum vellosii e *G. sericeum* mostraram-se ativas em clones de *Plasmodium falciparum* (STEELE et al. 2002; MBEUNKUI et al. 2012). Recentemente, a atividade antileishmania de alguns alcaloides presente no gênero *Geissospermum* tem sido relatada (REINA et al. 2012). Portanto, o presente estudo se fundamenta na:

- Quimiotaxonomia: estudos isolaram alcaloides indólicos (RAPOPORT et al. 1958; PACCIONI e HUSSON, 1978; MOORE e RAPOPORT, 1973; CHIARONI e RICHE, 1979; STEELE et al. 2002; RAPOPORT e MOORE, 1962; WERNER et al. 2009; DIAS, 2012; MBEUNKUI; GRACE; LILA, 2012; REINA et al. 2012), alcaloides bisindólicos (RAPOPORT et al. 1958; RAPOPORT e MOORE, 1962; CHIARONI e RICHE, 1979; ALMEIDA et al. 2009; MBEUNKUI; GRACE; LILA, 2012; REINA et al. 2012), e alcaloide β -carbolínico (HUGHES e RAPOPORT, 1958; STEELE et al. 2002; REINA et al. 2012).
- Farmacologia: espécies de *Geissospermum* apresentaram atividade antiparasitária (MUÑOZ et al. 2000; STEELE et al. 2002; BERTANI et al. 2005; BRANDÃO, 2012; CAMARGO, 2012; MBEUNKUI et al. 2012; REINA et al. 2012; SANTOS e

VOLPATO, 2015), sendo o alcaloide indólico O-demetilaspidospermina ativo contra formas promastigotas de *Leishmania infantum* (REINA et al. 2012).

Mediante o potencial biológico leishmanicida das espécies *Geissospermum vellosii* e *G. sericeum*, este estudo justifica-se pela necessidade de avaliar tal potencial e auxiliar na elucidação dos possíveis metabólitos responsáveis pela atividade biológica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Leishmaniose

A posição sistemática do protozoário *Leishmania* é: reino Protista, subreino Protozoa, filo Sarcomastigophora, subfilo Mastigophora, classe Zoomastigophora, ordem Kinetoplastida, subordem Tryposomatida, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania* (LEVINE et al. 1980). O gênero *Leishmania* foi subdivido em complexos fenotípicos agrupados em dois subgêneros: *leishmania* e *Viannia*. O subgênero *Viannia* causa leishmaniose cutânea e mucocutânea compreende as espécies como: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) panamensis*, e *L. (V.) peruviana* (LAINSON e SHAW, 1987). O subgênero *Leishmania* abrange espécies que causam a leishmaniose cutânea no Velho Mundo como *L. (L.) major* e *L. (L.) tropica* e dois complexos, o complexo *L. mexicana* onde se incluem as espécies *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) pifanoi* e *L. (L.) venezuelensis* e o complexo *L. donovani* cujos membros são *L. (L.) donovani*, *L. (L.) infantum* e *L. (L.) chagasi* que causam leishmaniose cutânea e visceral, respectivamente (GRIMALDI JUNIOR; TESH; McMAHON-PRATT, 1989).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), aproximadamente, 350 milhões de pessoas estão expostas ao risco de contrair a doença, com registro estimado de 20.000 a 30.000 mortes anualmente (WHO, 2015). A OMS adota como princípio de classificação das leishmanioses os tipos de manifestações da doença que se diferenciam em duas formas: visceral e tegumentar ou cutânea. A tegumentar divide-se em três subtipos: mucocutânea, cutânea e cutânea difusa (CHAN-BACAB e PEÑA-RODRÍGUEZ, 2001). No entanto, David e Craft (2009) dividem a leishmaniose em dois grupos: leishmanioses dermatrópicas/mucotrópicas (tegumentares) e as viscerotrópicas.

Os primeiros registros de leishmaniose tegumentar foram feitos por civilizações pré-Incas do Peru e Equador (Figura 1), são datados do início do primeiro século antes de Cristo. No período de colonização espanhola nas Américas (séculos XV e XVI) existem textos que mencionam o risco de se contrair as “doenças dos Andes” (CAMPOS, 2007). A viagem de Frei Dom Hipólito Sanches de Fayas y

Quiros (1827), de Tabatinga (AM) até o Peru, relatam presença desta doença no Brasil (PARAGUASSU-CHAVES, 2001).



Figura 1 - Cerâmica pré-Inca indicando lesões causadoras de deformações cutâneas na face em caso de leishmaniose.

Fonte: CAMPOS, 2007.

No entanto, há relatos que Moreira (1895) foi o primeiro a identificar caso de leishmania no Brasil, nesse período era conhecida como botão endêmico dos países quentes, chamado “Botão da Bahia” ou “Botão de Biskra”. Aragão (1922), demonstrou o papel do flebotomíneo na transmissão da leishmaniose tegumentar; sendo a descoberta de animais parasitados (roedores) relatado por Forattini (1958).

A leishmaniose tegumentar constitui um problema de saúde pública em 82 países, distribuídos em quatro continentes (Américas, Europa, África e Ásia), considerada a forma mais disseminada entre os tipos de leishmaniose, pois estima-se que ocorra uma incidência anual de 0,7 a 1,3 milhões de novos casos, dos quais mais de dois terços ocorrem em seis países: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, República Islâmica do Irã e República Árabe da Síria (WHO, 2015). Diante desse cenário a leishmaniose tegumentar é considerada uma das seis mais importantes doenças infecciosas, pelo seu alto coeficiente de detecção e capacidade de produzir deformidades (BRASIL, 2010a).

Casos de leishmaniose tegumentar (também conhecida como Leishmaniose Tegumentar Americana – LTA) são notificados em quase todo continente

Americano, com exceção do Chile e Uruguai, há registro de casos desde o extremo sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina (BRASIL, 2010a). Em 2014 foram identificados 20.296 casos de LTA no Brasil, destes 10.387 (51,2%) casos ocorreram na região Norte, sendo que no Estado do Pará registrou-se o maior número de casos, 4.356 (41,9%), seguido pelos Estados do Amazonas, 1.801 (17,3%) e Rondônia, 1.148 (11,1%; BRASIL, 2014).

Os vetores, mosquitos denominados flebotomíneos, durante o repasto sanguíneo em animal infectado adquirem o parasito (Figura 2:5). No aparelho digestivo do flebotomíneo fêmea, o parasito é direcionado ao intestino médio. Este é envolto pela matriz peritrófica, estrutura quitinosa que envolve o sangue ingerido, separando-o do epitélio intestinal (Figura 2:6; WALTERS, 1993; PIMENTA et al. 1997; SECUNDINO et al. 2005). Após um período de 12 a 20 horas, as amastigotas diferenciam-se em promastigotas (Figura 2:7; SACKS e PERKINS, 1984; DESCOTEAUX e TURCO, 1999). Esta forma passa por mudanças morfológicas, fisiológicas e bioquímicas, diferenciando-se no final do ciclo em promastigotas metacíclicas infectantes (Figura 2:8; SACKS, 1992).

Durante o repasto sanguíneo a fêmea regurgita estes parasitos infectivos (promastigotas metacíclicas) que estão presentes em grande quantidade em seu trato digestivo (ANTOINE et al. 1998). Após a inoculação na pele do hospedeiro, a forma promastigota metacíclica é primeiramente fagocitada por neutrófilos (Figura 2:1; CHARMOY et al. 2010), protegendo o parasito do meio extracelular hostil (VAN ZANDBERGEN et al. 2004). Após 4 a 8 horas, a forma promastigota invade os macrófagos, sendo envoltas pelo vacúolo fagocitário, transformando-se em amastigotas intracelulares (Figura 2:2 a 2:3; HANDMAN e BULLEN, 2002). Nos macrófagos são internalizadas no fagossoma, que logo se funde com os lisossomos, dando origem ao vacúolo fagolisossomal, onde o parasito permanece em ambiente hostil, contendo enzimas lisossomais e metabólitos reativos do oxigênio, mecanismos de sinalização celular, produção de óxido nítrico e citocinas (CUNNINGHAM, 2002).

A forma amastigota alojada nos fagossomos dos monócitos, histiócitos e macrófagos vivem e se multiplicam por divisão assexuada até romperem a célula, disseminando-se pela via hematogênica e linfática (Figura 2:4; LAINSON e SHAW, 1992), inicia uma relação inflamatória e proporciona a atração de outros macrófagos gerando um ciclo vicioso (RASO e GENARO, 1994). Ocorre em seguida, a ruptura

da membrana do macrófago repleto de amastigotas, que por sua vez são novamente fagocitadas (Figura 2:4; GENARO e REIS, 2005).

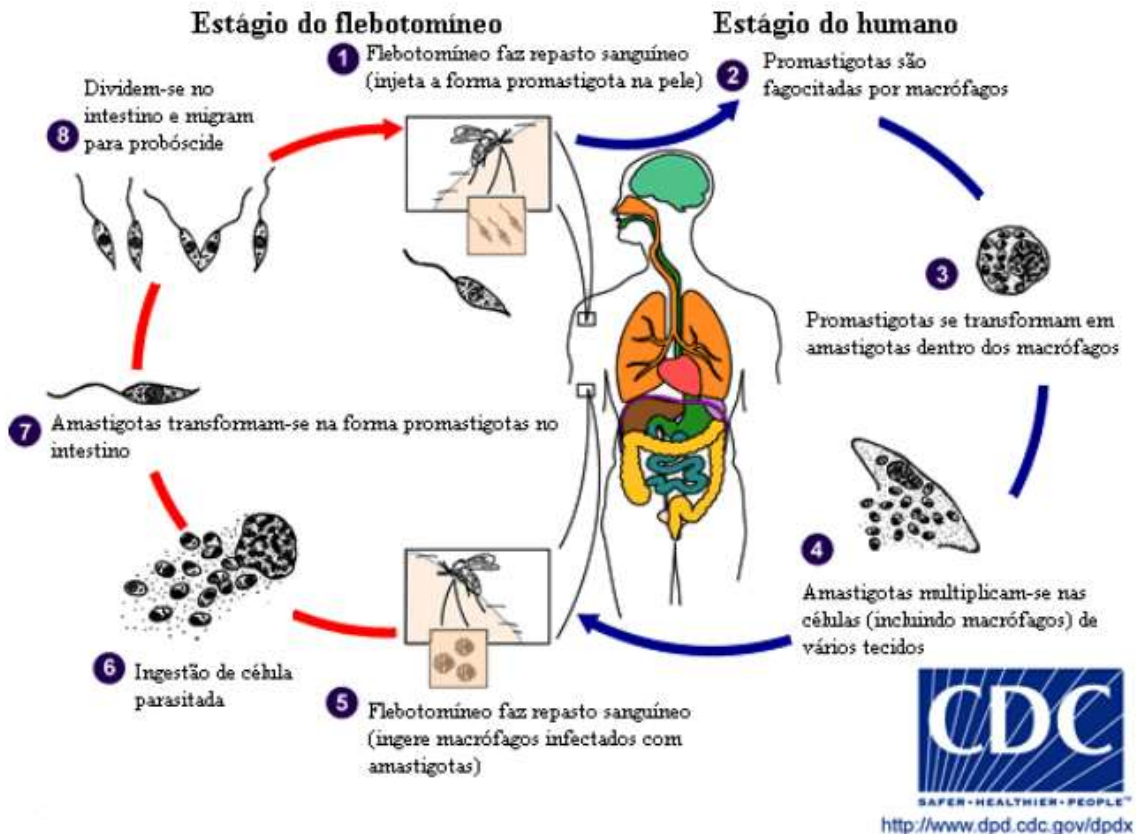
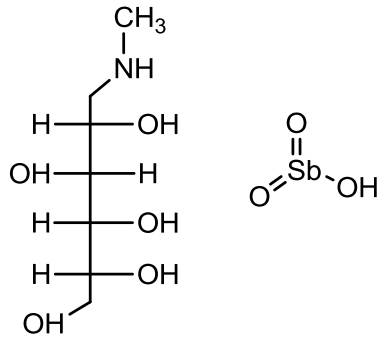


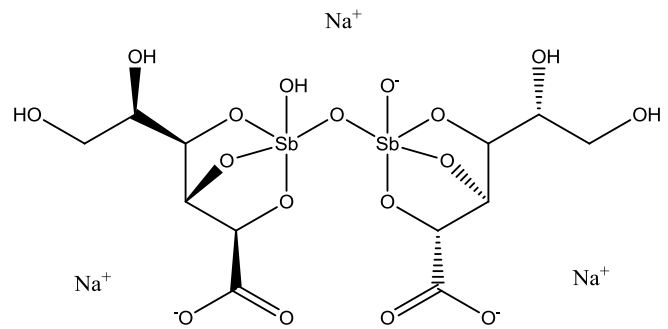
Figura 2 - Ciclo biológico da *Leishmania* spp.

Fonte: Centers for Disease Control and Prevention (2015, tradução MORAIS, 2015).

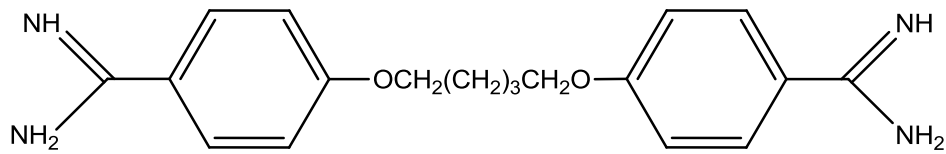
O tratamento convencional, utilizado desde 1945 (MARSDEN, 1985), para as leishmaniose (tegumentar e visceral) é realizado com os sais de antimônio pentavalentes (Sb^{5+} ; HERWALDT, 1999; RATH et al. 2003; BRASIL, 2007), sendo os seguintes fármacos disponíveis atualmente: Antimoniato N-metil glucamina (1; Glucantime®) ou Antimoniato de meglumina e Estibogluconato de sódio (2; Pentostan®, não comercializado no Brasil). Além destes fármacos, a anfotericina B e as pentamidinas (sulfato de pentamidina e mesilato de pentamidina; Figura 3; BRASIL, 2010a) são consideradas alternativas terapêuticas.



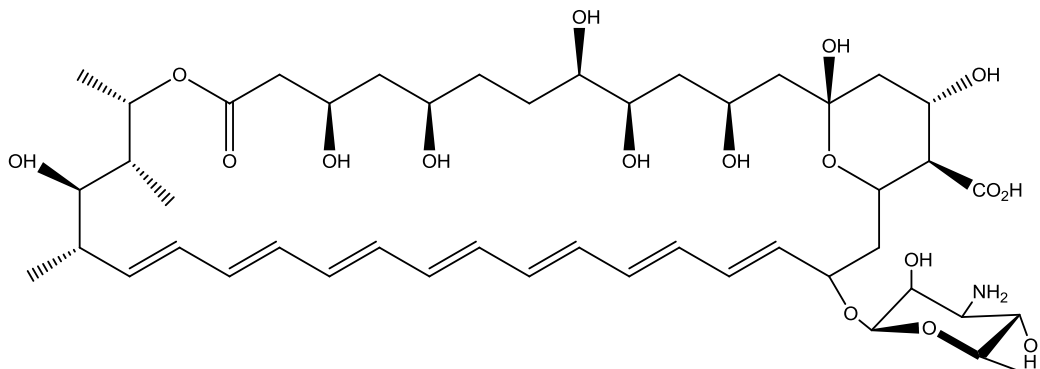
1 – Antimoniato N-metil glucamina



2 – Estibogluconato de sódio



3 - Isotionato de pentamidina



4 – Anfotericina B

Figura 3 - Principais fármacos usados para tratamento de leishmaniose.

O mecanismo de ação dos antimoniais ainda não está completamente elucidado (DEMICHELI e FRÉZARD, 2005), porém acredita-se que o antimônio pentavalente ou a forma ativa trivalente interfira na produção de energia em amastigotas de *Leishmania*, inibindo o processo de β -oxidação de ácidos graxos e glicólise do parasito, conduzindo a uma depleção dos níveis de adenosina trifostato (ATP; TRACY e WEBSTER JUNIOR, 1996; BALAÑA-FOUCE et al. 1998).

Os antimoniais apresentam uma série de desvantagens, destacando-se: administração por via parenteral (intramuscular ou endovenosa), tempo de tratamento prolongado (20 a 30 dias, dependendo da forma clínica), potencial hepatotóxico, cardiotoxico, nefrotóxico, dores musculares, entre outras reações adversas. Estas desvantagens acabam contribuindo para a interrupção ou abandono da quimioterapia pelo paciente antes de seu término, sugerindo a necessidade de novas alternativas terapêuticas (DEMICHELI e FRÉZARD, 2005).

A anfotericina B (desoxicolato; Figura 3:4) é um antibiótico poliênico com atividades antifúngica e leishmanicida (SOARES BEZERRA; LEON; GENESTRA, 2004). Este fármaco se liga ao ergosterol presente na membrana do microrganismo, alterando a permeabilidade de membrana e do equilíbrio osmótico, causando morte (SAHA; MUKHERJEE; BHADURI, 1986; OLLIARO e BRYCESON, 1993; URBINA, 1997). Este fármaco é utilizados em casos clínicos graves de Leishmaniose não responsiva ao tratamento convencional ou com ameaça de morte (OSTROSKY-ZEICHMER et al. 2003).

As reações adversas da anfotericina, são dose dependentes, sendo tóxica para as células do endotélio vascular, ocasionando flebite. Também tem sido relatados cefaleia, febre, calafrios, astenia, dores musculares e articulares (artralgia), hipercalemia, vômitos e hipotensão em caso de infusão rápida (BERMAN, 1998). Um quadro a ser considerado relevante é o comprometimento renal que acontece praticamente em todos os pacientes durante o tratamento (BERDICHEVSKI, 2003), porém quando o diagnóstico for detectado precocemente, possibilitando rápido ajuste do intervalo entre as doses, proporciona normalização da função renal (RIGO; RIGO; HONER, 2008). Além disso, o alto custo dos compostos torna o tratamento muitas vezes inviável (SINGH e SIVAKUMAR, 2004).

Em síntese, os fármacos disponíveis para o tratamento da leishmaniose possuem elevada toxicidade (PELLISSARI et al. 2011), via de administração parenteral (intramuscular ou endovenosa) geralmente dolorosa e desconfortável,

necessitando de administrações por longo períodos, o que requer hospitalização, acarretando em desconforto ao paciente e alto custo aos cofres públicos (BRAGA et al. 2007), além de interferir na rotina de trabalho do paciente, reduzindo a capacidade produtiva econômica da família. Diante desse cenário, torna-se urgente a busca de novas alternativas de tratamento para leishmaniose.

As plantas são importantes fontes de descoberta de fármacos, principalmente no que diz respeito a fármacos antiparasitários (ANTHONY; FYFE; SMITH, 2005). Em áreas endêmicas de leishmaniose, grande parte da população que adquire a doença não tem acesso a medicamentos, logo utilizam as plantas para tratar e aliviar os sintomas (CHAN-BACAB e PEÑA-RODRIGUEZ, 2001). Estas plantas possuem metabólitos secundários (MORAIS e BRAZ-FILHO, 2007) que podem atuar na destruição de agentes invasores (MISRA et al. 2009; LINDOSO et al. 2012) ao interferir no metabolismo parasitário ou alterando a permeabilidade de sua membrana. Os metabólitos mais promissor para a leishmania são os alcaloides (MAHIOU et al. 1994; FOURNET et al. 1996; QUEIROZ et al. 1996; NOVA, 2012). Portanto, no presente estudo optou-se por trabalhar com a família Apocynaceae, caracterizada quimicamente pela ocorrência frequente de estruturas alcaloídicas (PEREIRA et al. 2007).

2.2 Família Apocynaceae

A família Apocynaceae (Antoine Laurent de Jussieu, 1789) é classificada como: Angiospermas → Eudicotiledôneas → Núcleo Eudicotiledôneas → Asterídeas → Euasterídeas I, na ordem Gentianales (THE ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP, 2003). Na Apocynaceae se incluem cinco subfamílias: Rauvolfioideae (cosmopolita; contando com 10 tribos e 83 gêneros), Apocynoideae (cosmopolita; contando com 8 tribos e 80 gêneros), Periplocoideae (Origem europeia; contando com 33 gêneros), Secamonoideae (Origem européia; 8 gêneros) e Asclepiadoideae (cosmopolita; contando com 4 tribos e 172 gêneros; ENDRESS e BRUYNS 2000; ENDRESS; LIEDE-SCHUMANN; MEVE, 2007).

A Apocynaceae é considerada uma dicotiledônea, constituída por cerca de 424 gêneros (ENDRESS e BRUYNS, 2000) e 5000 espécies (ENDRESS, 2004). No

Brasil, foram identificados aproximadamente 95 gêneros e 850 espécies (SOUZA e LORENZI, 2008), sendo 32 gêneros encontrados apenas na Amazônia (PEREIRA et al. 2007).

Essa família ocorre em regiões temperadas (ENDRESS, 2004; JUDD et al. 2009), tropicais e subtropicais (LORENZI, 1998). Suas espécies se desenvolvem em vários habitats, desde florestas tropicais úmidas até regiões semiáridas; em baixas e altas altitudes, em solos secos, afloramentos rochosos, áreas inundadas e, algumas vezes, nas margens dos rios (RAPINI, 2004). Tratam-se de herbáceas, subarbustos, árvores e trepadeiras, das quais muitas produzem látex (JOLY, 1998; DI STASI e HIRUMA-LIMA, 2002), as folhas em geral opostas e verticiladas com estípulas rudimentares; flores pequenas ou grandes e vistosas, tipicamente pentâmeras, hermafroditas, diclamídeas; fruto seco capsular ou indeiscente, ou então dois frutículos, secos, deiscentes (GRAEBNER, 2003).

Muitas de suas espécies têm grande importância econômica na alimentação, como fornecedoras de madeira ou para fins medicinais (JUDD et al. 2009). Também possui grande importância na medicina popular, sendo utilizada para tratamento de problemas cardíacos, malária, doenças dermatológicas, como analgésico, vermífugo, abortivo, febrífugo, sedativo, para vômito, cólicas, diabetes, inflamações, câncer, úlceras, gripe, tumores, problemas estomacais, doenças respiratórias, laxante, diarreia, reumatismo, expectorante, luxações, asma, problemas hepáticos, escabiose e como veneno (SANTOS et al. 2013).

Essa família se caracteriza principalmente por conter alcaloides monoterpênicos (BOLZANI et al. 1987), que podem promover relevantes mudanças fisiológicas, apresentando grau variado de toxicidade (CORDELL, 1981). Entre estes alcaloides destacam-se: vimblastina, vincristina (inibidores da polimerização das proteínas do fuso mitótico) e reserpina (inibidor da captação de noradrenalina), usados na clínica (NEUSS, 1970). Alguns alcaloides têm apresentado atividade antiparasitária (OSORIO; MONTOYA; ARANGO, 2006), como exemplo a quinina.

A atividade antimalárica de alcaloides originários de espécies pertencentes a esta família tem sido amplamente estudada, em especial de espécies do gênero *Aspidosperma* e *Geissospermum* (SARAIVA, 2012). No entanto, existe uma carência de estudos para atividade em outros parasitos, como: *Leishmania* e *Trypanosoma*. Vale ressaltar que entre as 10 espécies mais importantes da Amazônia, em termos

medicinais, encontram-se a *Geissospermum vellosii* (PECKOLT, 1942) e a *Geissospermum sericeum* (OLIVEIRA et al. 2003).

2.2.1 GÊNERO *Geissospermum*

O médico e botânico brasileiro Francisco Freire Allemão de Cysneiros (1845) descreveu, levando em consideração a disposição genérica das sementes e as características diferenciais da planta e distintas de todas apresentadas por gêneros existentes, o gênero *Geissospermum* (SARAIVA, 2012). Em termos taxonômicos, o gênero *Geissospermum* pertence à classe Equisetopsida C. Agardh, subclasse Magnoliidae Novák ex Takht, superordem Asteranae Takht, ordem Gentianales Juss. ex Bercht. & J. Presl e família Apocynaceae Juss. (MISSOURI BOTANICAL GARDEN, 2015). Seis espécies de *Geissospermum* são reconhecidas, todas nativas do Brasil: *G. argenteum* Woodson, *G. fuscum* Markgr., *G. laeve* (Vell.) Miers (sononímia – *G. martianum* Miers, *G. vellosii* Fr. All., *Tabernaemontana laevis* Vell.), *G. reticulatum* A. H. Gentry, *G. sericeum* Benth. & Hook. f. e *G. urceolatum* A. H. Gentry (CAMARGO et al. 2013).

Este é um pequeno gênero de plantas nativas que ocorrem em países da Região Amazônica (WCSP, 2014), no Nordeste e Sudeste do Brasil, mas principalmente em florestas de terra firme dos Estados do Amazonas, Amapá e Pará (FORZZA, 2010; SILVA et al. 2014).

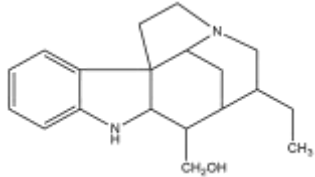
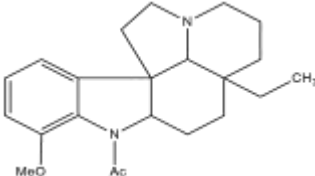
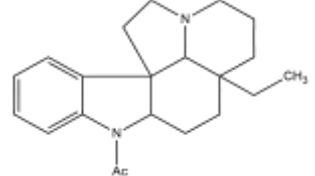
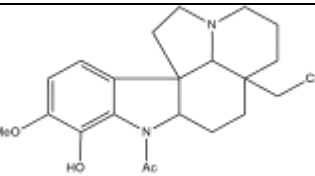
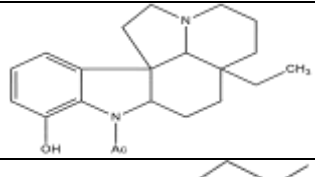
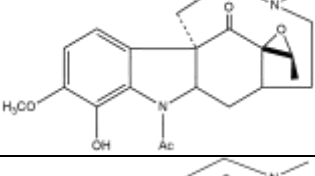
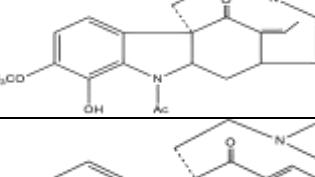
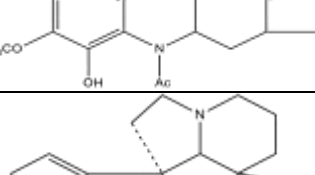
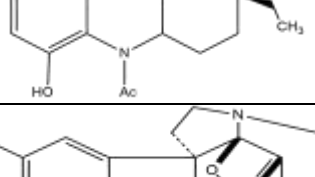
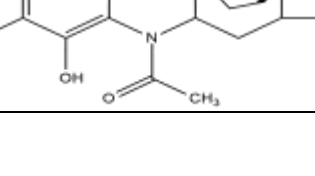
Em 1838, o farmacêutico brasileiro, Ezequiel Corrêa dos Santos, isolou o princípio ativo das cascas da *G. vellosii* Allemão (Pau-pereira) e o descreveu como um alcaloide, denominando-o pereirina (ALMEIDA et al. 2009). Outros autores atribuem à fórmula molecular da pereirina à geissoschizolina (Quadro 1:5; BERTHO; KOLL; FEROSIE, 1958; BERTHO e KOLL, 1961). O estudo de Almeida (2009) comprovou que a pereirina é de fato uma mistura complexa, contendo majoritariamente a geissoschizolina (Quadro 1:5), um alcaloide indólico. Mais tarde outros alcaloides foram isolados e identificados de outras espécies de *Geissospermum* (CAMARGO et al. 2013).

Os alcaloides indólicos podem atuar no sistema nervoso central, alterando diferentes vias (opióide, GABAérgica, serotonérgica e dopaminérgica). Estas

alterações podem resultar em efeitos sedativos, anestésico e relaxamento muscular. Alterações no sistema nervoso autônomo podem ocorrer, ocasionando efeito diurético, vasoconstritor periférico, estimulante respiratório e espasmogênico intestinal (PEREIRA et al. 2007).

Vários estudos fitoquímicos foram realizados com espécies pertencentes ao gênero *Geissospermum*, isolando alcaloides do tipo indólico, β -carbolínico e bisindólico. O Quadro 2 resume os principais estudos fitoquímicos de *Geissospermum*.

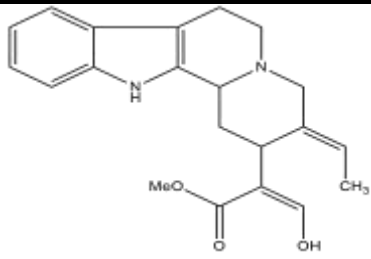
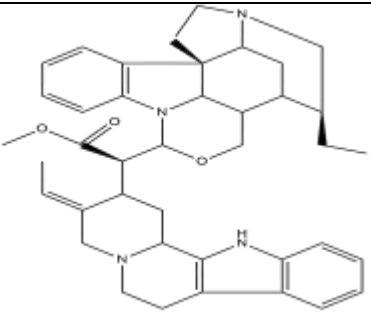
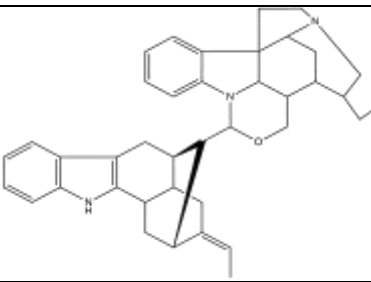
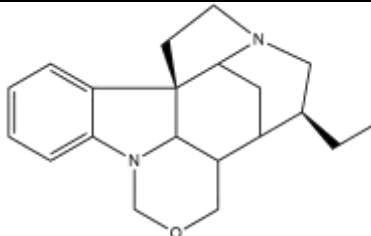
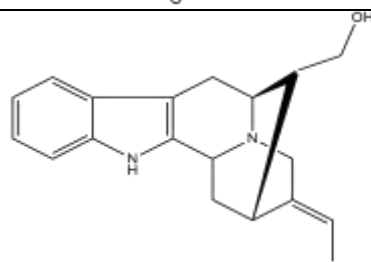
Quadro 1 - Metabólitos isolados a partir do gênero *Geissospermum*.

Metabólitos	Estrutura química	Espécie vegetal	Órgão Vegetal
Geissoschizolina (5)		<i>G. vellosii</i>	Cascas ^{a,b}
Aspidospermina (6)		<i>G. argenteum</i>	Cascas e folhas ^c
Desmetoxiaspidospermina (7)			
Aspidoscarpina (8)			
Demetilaspidospermina (9)			
10-demetoxi-12-hidroxi-17,19-epoxigeissovelina (10)			
(Z)-10-demetoxi-12-hidroxi-geissovelina (11)			
(E)-10-demetoxi-12-hidroxi-geissovelina (12)			
O-desmetilaspidospermina (13)			
Geissospermidina (14)			

Quadro 1 – Continuação.

Metabólitos	Estrutura química	Espécie vegetal	Órgão Vegetal
10-metoxi-geissospermidina (15)		<i>G. reticulatum</i>	Casca e folhas ^d
N-deacetil-N-butanoil-geissospermidina (16)			
11-metoxi-geissospermidina (17)			
Flavopereirina (18)			
Geissosreticulatina (19)		<i>G. sericeum</i>	Casca ^e
Geissoschizolina N ⁴ -óxido (20)			
1,2-deidrogeissoschizolina (21)			
Apogeissoschizina (22)		<i>G. vellosii</i>	Casca ^f

Quadro 1 – Continuação.

Metabólitos	Estrutura química	Espécie vegetal	Órgão Vegetal
Geissoschizina (23)		<i>G. vellosii</i>	Casca ^f
Geissospermina (24)			
Geissolosimina (25)		<i>G. vellosii</i>	Casca ^{g,h}
Geissoschizona (26)			
Vellosiminol (27)			

Legenda: a- BERTHO; KOLL; FEROSIE, 1958; b- BERTHO e KOLL, 1961; c- PACCIONI e HUSSON, 1978; d- REINA et al. 2012; e- STEELE et al. 2002; f- RAPOPORT et al. 1958; g- MBEUNKUI et al. 2012; h- RAPOPORT e MOORE, 1962.

Quadro 2 - Avaliação biológica do gênero *Geissospermum*.

Atividade Biológica	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Amostra	Atividade comprovada	Referência
Cardiovascular	<i>G. urceolatum</i>	Cascas	Fração alcaloídica	Hipotensora e vasodilatadora	MARTINS, 2010
	<i>G. argenteum</i> Woodson	Cascas		Hipotensora, vasodilatadora e efeito curarizante	MORAIS, 2012
Antimicrobiana	<i>G. argenteum</i> Woodson	Cascas	Extrato Etanólico	Cepas ATCC de <i>S. aureus</i> e <i>P. aeruginosa</i> , e cepa <i>S. aureus</i> multi-drogas resistente.	CORREIA et al. 2008
		Folhas, galhos e cascas	Extrato metanólico, Extrato aquoso e Frações (hexânica, clorofórmica, Acetato de etila e metanol:água)	Difusão em ágar (parcialmente ativos contra <i>S. aureus</i> e <i>S.</i>). Teste de microdiluição (ativo para <i>S. aureus</i> , <i>S. mutans</i> e levedura <i>C. albicans</i>).	CAMARGO, 2012
				Ativo <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	
Antiplasmódica					
Antitripanocida	<i>G. reticulatum</i> A. Gentry	Cascas e folhas	Extrato hidroalcoólico e alcaloides isolados	O-demetilaspidospermina e N-deacetil-N-butanoilgeissospermidina foram os únicos ativos	REINA et al. 2012
Antileishmania					

A atividade cardiovascular de *Geissospermum* tem sido descrita (MARTINS, 2010; MORAIS, 2012). A fração alcaloídica de *G. urceolatum* foi avaliada em relação à pressão arterial e contração do músculo liso de ratos. Essa fração (doses= 1,3 e 10 mg/kg, e.v.) apresentou ações hipotensora e vasodilatadora, com provável participação da via do óxido nítrico e inibição do influxo de cálcio em células musculares lisas (MARTINS, 2010). Outro estudo avaliou a ação cardiovascular da fração alcaloídica de *G. argenteum* Woodson e também indicou ação vasodilatadora (1,0 a 10 µg/mL) e hipotensora (injeção de 0,3 a 3,0 mg/kg, e.v.) rápida e reversível (MORAIS, 2012). A partir da fração alcaloídica de outra espécie, *G. vellosii*, foram isolados os alcaloides geissospermina (Quadro 1:24) e geissoschizolina (Quadro 1: 5; TANAE et al. 2006). Logo, acredita-se que esses alcaloides fazem parte da composição de *G. urceolatum*, estando relacionados a atividade hipotensora com provável bloqueio de canais e receptores nicotínico, produzindo um bloqueio neuromuscular intenso (MARTINS, 2010).

A fração de alcaloides de *G. urceolatum* (doses=100 a 300 mg/kg) foi administrada por via intraperitoneal em camundongos Balb/C, sendo observado dispneia e cianose, sugerindo ação curarizante (MARTINS, 2010). Além disso, em doses de 3,0 mg/kg (fração alcaloídica, *G. argenteum*) produziu efeito curarizante, com parada respiratória e anóxia, sem comprometimento direto do sistema nervoso central (MORAIS, 2012).

O extrato etanólico de *G. argenteum* também foi submetido a avaliação antimicrobiana em difusão em ágar. Este apresentou atividade contra cepas ATCC de *S. aureus* com Concentração Inibitória Mínima (CIM= 80,0 µg/mL) e *P. aeruginosa*, (CIM= 20,0 µg/mL), além de inibição de cepa *S. aureus* multi-drogas resistente (CIM= 5 µg/mL). Acredita-se que essa atividade seja justificada pelo constituinte majoritário do extrato etanólico, provavelmente alcaloide indólico pois sabe-se que esse gênero é rico em alcaloides deste tipo (CORREIA et al. 2008).

Outro estudo avaliou ação antimicrobiana através da difusão em ágar e por microdiluição. O extrato aquoso das folhas, extrato metanólico das cascas (EMC), frações (acetato de etila e metanólica) das cascas foram parcialmente ativos contra *S. aureus*. Para *S. mutans* o EMC e fração hexânica das cascas, também foram parcialmente ativos. Todas as amostras foram inativas frente a cepas de *E. coli* e *C. albicans*. No teste de microdiluição, os melhores resultados foram: EMC contra *S. aureus*, extrato metanólico de galhos contra *S. mutans*, e extrato metanólico de

folhas contra levedura *C. albicans*, ambos com CIM de 0,63 mg/mL (ativo). Este trabalho verificou que essa espécie possui predominantemente alcaloides em sua composição química (CAMARGO, 2012).

A espécie *G. argenteum* também foi submetida a avaliação antiplasmódica frente à cepa cloroquina resistente de *P. falciparum*. Foram utilizados extratos e frações de galhos, folhas e cascas. O extrato metanólico das cascas (CI₅₀ 4,6 µg/mL) e a fração clorofórmica (obtida da casca por partição, CI₅₀= 2,0 µg/mL), foram os únicos considerados ativos em ensaio *in vitro*, e esses efeitos foram relacionados aos alcaloides (CAMARGO, 2012).

Os extratos hidroalcoólico e alcaloides isolados de cascas e folhas de *G. reticulatum* A. Gentry foram submetidos a avaliação das atividades leishmanicida e tripanocida (*Leishmania infantum* e *Trypanossoma cruzi*). O fracionamento contribuiu para as atividades, sendo O-demetilaspidospermina ativo contra *L. infantum* (CI₅₀= 7,7 µg/mL) e pouco ativo em *T. cruzi* (CI₅₀ = 41,7 µg/mL). O O-demetilaspidospermina apresentou certa seletividade (CC₅₀= 16,7 µg/mL e Índice de seletividade= 2,17). Quando se compara a toxicidade de O-demetilaspidospermina aos fármacos de referência, anfotericina B e nifurtimox, observa-se menor citotoxicidade do alcaloide (Anfotericina B e nifurtimox; CC₅₀= 10,3 e 13,9 µg/mL, respectivamente). O N-deacetil-N-butanoilgeissospermidina, quando comparado ao outro alcaloide, mostrou-se menos ativo contra *L. infantum* (CI₅₀= 52,2 µg/mL). Em síntese, a atividade leishmanicida dos extratos está relacionada ao O-demetilaspidospermina (REINA et al. 2012).

2.2.1.1 *Geissospermum vellosii* Allemão

A *G. vellosii* é uma árvore, com altura em torno de 10-15 metros, com o tronco de 40-60 cm de diâmetro (LORENZI, 1992). Possui ramos ferrugíneos, folhas alternas, curto-pecioladas, glabras, de forma oblongo-elítica, ápice acuminado, base acunhada e margem ondulada; inflorescência cimosa; flores alvacentas; os lacínios do cálice sem emergências glandulares na parte interna; corola hipocrateriforme; ovário súpero com estigma claviforme, piloso; e cápsula carnosa (CORRÊA, 1974; BARROSO et al. 1986).

Em termos botânicos, dois estudos foram realizados sobre enquadramento taxonômico desta espécie (Quadro 3). No entanto, para a classificação aceita (MISSOURI BOTANICAL GARDEN, 2015), considera-se boa parte abordada por Cronquist (1981), porém com alteração de classe de Magnoliophyta para Equisetopsida. Além disso, a literatura descreve o nome *Geissospermum vellosii* Allemão é uma sinonímia da espécie *Geissospermum leave* (Vell.) Miers (CAMARGO et al. 2013; TPL, 2016; WCSP, 2016).

Quadro 3 – Enquadramento taxonômico de *Geissospermum vellosii*.

Classificação	Segundo Cronquist (1981)	Segundo Engler (Joly, 1998)
Divisão	Magnoliophyta	Angiospermae (Antophyta)
Classe	Magnoliopsida	Dicotyledoneae
Subclasse	Asteridae	Sympetalae
Ordem	Gentianales	Gentianales
Família	Apocynaceae	Apocynaceae
Gênero	<i>Geissospermum</i>	<i>Geissospermum</i>
Espécie	<i>G. vellosii</i>	<i>G. vellosii</i>

A *G. vellosii* está distribuída no Brasil, Peru e Bolívia (MISSOURI BOTANICAL GARDEN, 2015). No Brasil ocorre nas regiões Norte (Amapá, Pará, Amazonas), Nordeste (Maranhão, Bahia), Centro-Oeste (Distrito Federal) e Sudeste (Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro; KOCH et al. 2016). Esta planta é conhecida popularmente por várias denominações, de acordo com a região onde era encontrada: Pau-Pereira (MARION, 1952), Pau-Forquilha, Pau-de-Pente, Pau-de-colher, Pau-pita, Camará, Chapéu-de-sol, Para-tudo (FERREIRINHA, 1884), Camará-de-bilro, Camará-do-mato, Canudo amarguroso, Pinguaciba, Pereiroá, Pereiro, Ubá-açú, Tringuaaba (PIO CORRÊA, 1984), Maria Congo (BERTANI et al. 2005), Bergibita (TROPILAB, 2007), Quinarana (ALMEIDA, 2010), Quina-quina (VALENTE, 2006), Quina-amargosa, Quina de pobre (BURTON, 1977; MAWE, 1978), Guatambu e Peroba (WAGNER; BLADT; ZGAINSKI, 1984).

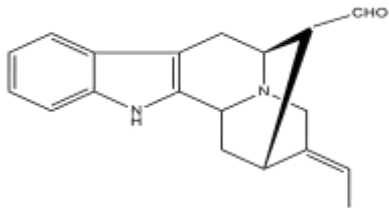
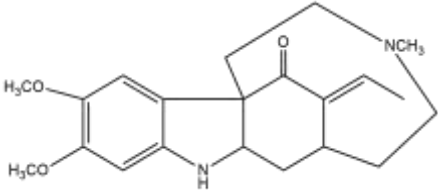
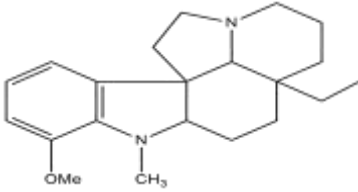
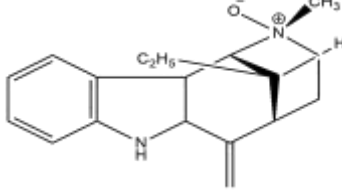
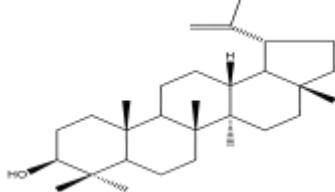
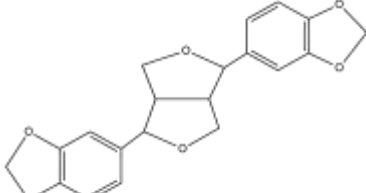
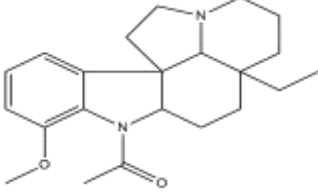
A *G. vellosii* possui as seguintes alegações de uso popular: antisséptico (OLIVEIRA, 1883), tratamento da dor, perda de apetite (JÁCOME et al. 2003; DOS SANTOS, 2007; ALMEIDA et al. 2009; CAMARGO et al. 2013), estimulante sexual (DOS SANTOS, 2007; WERNER et al. 2009), febrífuga (STALCUP, 2000; DOS SANTOS, 2007; ALMEIDA et al. 2009; WERNER et al. 2009), problemas hepáticos

(MUÑOZ et al. 2000; WERNER et al. 2009), problemas intestinais e erisipelas (STALCUP, 2000), distúrbios estomacais ou má digestão (JÁCOME et al. 2003; DOS SANTOS, 2007; ALMEIDA et al. 2009; WERNER et al. 2009; CAMARGO et al. 2013;), constipação intestinal (JÁCOME et al. 2003; DOS SANTOS, 2007; ALMEIDA et al. 2009; WERNER et al. 2009; CAMARGO et al. 2013), tontura (DOS SANTOS, 2007; ALMEIDA et al. 2009; JÁCOME; SOUZA; OLIVEIRA, 2003), vômito (MUÑOZ et al. 2000), considerada tônica (STALCUP, 2000), antimalárico (MILLIKEN, 1997; MUÑOZ et al. 2000; JÁCOME; SOUZA; OLIVEIRA, 2003; BERTANI et al. 2005; VIGNERON et al. 2005; DOS SANTOS, 2007; CORREIA et al. 2008; WERNER et al. 2009; MBEUNKUI et al. 2012a; CAMARGO et al. 2013), prevenção e tratamento de câncer de próstata (CAMARGO, 2012).

As substâncias isoladas da *G. vellosii* foram: geissospermina (Quadro 1:24; MARION, 1952), vellosimina (Quadro 4:28; RAPOPORT e MOORE, 1962), flavopereirina (Quadro 1:18; HUGHES e RAPOPORT, 1958), velosiminol (Quadro 1:27), geissolosimina (Quadro 1:25; RAPOPORT e MOORE, 1962), geissovelina (Quadro 4:29; MOORE e RAPOPORT, 1973), geissoschizina (Quadro 1:23), geissoschizolina (Quadro 1:5; RAPOPORT et al. 1958), 12-metoxi-1-metil-aspidospermidina (Quadro 4:30; WERNER et al. 2009), pausperadina A (Quadro 4:31; ISHIYAMA et al. 2005), lupeol (Quadro 4:32), (+)-sesamina (Quadro 4:33), (+)-aspidospermina (Quadro 4:34; DIAS, 2012).

A geissospermina (Quadro 1:24) foi submetido a hidrólise ácida e os produtos de clivagem foram: geissoschizina (Quadro 1:23), apogeissoschizina (Quadro 1:22) e geissoschizolina (Quadro 1:5; RAPOPORT et al. 1958).

Quadro 4 - Metabólitos isolados de *Geissospermum vellosii*.

Metabólitos	Estrutura química	Órgão Vegetal
Vellosimina (28) ^a		Não descrito
Geissovelina (29) ^b		Cascas
12-metoxi-1-metil-aspidospermidina (30) ^c		Cascas
Pausperadina A (31) ^d		Não descrito
Lupeol (32)		
(+)-sesamina (33)		Cascas ^e
(+)-aspidospermina (34)		

Legenda: a- RAPOPORT e MOORE, 1962; b- MOORE e RAPOPORT, 1973; c- WERNER et al. 2009; d- ISHIYAMA et al. 2005; e- DIAS, 2012.

Estudos com avaliação antitumoral (BEMIS et al. 2009; YU e CHEN, 2014), antimicrobiano (SARAIVA, 2012; BRANDÃO, 2012), antiplasmódico (MUÑOZ et al. 2000; BERTANI et al. 2005; BRANDÃO, 2012; MBEUNKUI et al. 2012), anticolinesterásico, antinociceptivo (WERNER et al. 2009) e antioxidante (DIAS, 2012) foram realizados com espécie *G. vellosii* (Quadro 5). Em geral, estas atividades têm sido relacionadas aos alcaloides.

A fração alcaloídica das cascas de *G. vellosii* foi submetida para avaliação antitumoral em linhagem celular de câncer de próstata humano, sendo observado inibição significativa do crescimento tumoral nas concentrações de 100 ou 500 µg/mL. Esta atividade foi atribuída a indução de apoptose, onde observou que a inibição ocorre de forma concentração dependente. Esta fração foi avaliada em modelo *in vivo*, utilizando ratos machos atímicos nu/nu (nudes), com redução significativa do crescimento tumoral nas doses de 10 (80%) e 20 mg/kg (75%; BEMIS et al. 2009).

Outro estudo, avaliou a atividade antitumoral sobre câncer de próstata metastático, utilizando o extrato enriquecido com alcaloides β-carbolínicos das cascas de *G. vellosii*. Observou-se redução no crescimento celular e indução de apoptose através da inibição do fator de transcrição kappa B (NF-kB), sugere-se, a partir disso, que esse extrato apresenta potencial de proteção contra esse tipo de câncer (CHANG et al. 2014).

O extrato hidroalcoólico obtido de cascas de *G. vellosii* inibiram, de forma tempo dependente, o crescimento do câncer de ovário (CI₅₀= 180-235 µg/mL). Semelhante aos estudos anteriores, parece que esta atividade está relacionada a indução de apoptose, sendo que o aumento do tempo de exposição das células elevou a taxa de apoptose, ambos de forma dose e tempo dependente (YU e CHEN, 2014).

Na avaliação microbiológica de *G. vellosii* foram realizados ensaios: difusão agar, microdiluição e bioautográfico. O extrato etanólico inibiu o crescimento de *S. aureus* (halo de inibição=12,59 ± 0,611) e baseado em suas concentrações inibitórias mínimas (CIM= 125 µg/mL) e bactericida mínima (CBM = 250 µg/mL), pode-se sugerir que esta atividade é moderada (BRANDÃO, 2012). Outro estudo demonstrou a atividade deste extrato em *S. aureus* Oxacilina Resistente (MRSA; CIM= 125 µg/mL). Além disso, o Extrato Etanólico de *Geissopermum vellosii* (EEGV) quando associado ciprofloxacina, clindamicina e vancomicina apresentou um efeito

sinérgico em MRSA (SARAIVA, 2012). Este extrato também inibiu o crescimento de *P. aeruginosa*, porém a CIM foi superior a 1000 µg/mL por isso foi considerado inativo (BRANDÃO, 2012).

Semelhante ao EEGV, a fração alcaloídica mostrou-se ativa em *S. aureus* (halo de inibição=13,72 ± 2,0; CIM < 31,25 µg/mL; CBM= 250 µg/ml; BRANDÃO, 2012) e MRSA. Também foi observado efeito sinérgico em MRSA quando associado ciprofloxacina, clindamicina e vancomicina (SARAIVA, 2012). Estudos bioautográfico sugerem que a inibição do crescimento bacteriano esteja relacionada a aspidospermina (DIAS, 2012).

Em estudo *in vivo* o EEGV, na concentração de 22,5 mg/kg, inibiu o crescimento do clone de *P. falciparum* resistente a cloroquina (cepas W2) em 35% (BERTANI et al. 2005). Outro estudo, *in vitro*, este extrato mostrou-se promissor como antimalárico, tendo CI_{50} = 11 µg/mL (clone W2; BRANDÃO, 2012), CI_{50} = 3,1 µg/mL (clone F32) e CI_{50} = 2,0 µg/mL (clone Indochina). Estudo realizado com camundongos infectados com *P. berghei* (dose 100mg/kg), este extrato não reduziu a parasitemia e por isso foi considerado inativo (MUÑOZ et al. 2000). Quando se utilizou doses maiores do EEGV (125, 250 e 500 mg/kg de peso do animal, 3 dias de tratamento), no 5º dia não houve redução significativa na parasitemia. No entanto, no 8º dia, constatou-se redução parasitária, com 53%, 61% e 75%, respectivamente, considerando-se potencialmente ativos frente ao *P. berghei*, não sendo considerada tóxica (SANTOS e VOLPATO, 2015). A atividade antiplasmódica (clone de *P. falciparum* sensível a cloroquina D10) do extrato metanólico de *G. vellosii* foi avaliada, sendo este muito ativo (CI_{50} = 2,22 µg/mL; MBEUNKUI et al. 2012; Quadro 5).

Visando verificar se o fracionamento contribui para a atividade antiplasmódica, o EEGV foi submetido a partição ácido-base, obtendo-se fração de neutro e fração alcaloídica. As frações foram ativas em clone W2 de *Plasmodium falciparum* (CI_{50} = 8,87 µg/mL e CI_{50} = 2,63 µg/mL, respectivamente; BRANDÃO, 2012). Para identificar a(s) substância(s) responsável(is) pela atividade foram isolados alcaloides dos extratos (etanólico e metanólico) e estes foram avaliados em clones de *P. falciparum*, sendo obtidas as seguintes CI_{50} : diidroflavopereirina (Quadro 1:21, derivado de flavopereirina)- CI_{50} = 3,02 µM (MUÑOZ et al. 2000); flavopereirina (18)- CI_{50} = 11,53 e 1,83 µM (STEELE et al. 2002); geissolosimina (Quadro 1:25) CI_{50} = 0,66 µg/mL; geissospermina (Quadro 1:24) CI_{50} = 0,65 µg/mL; geissoschizolina (Quadro 1:5)

Cl_{50} = 0,89 μ g/mL; geissoschizona (Quadro 1:26)- Cl_{50} = 1,78 μ g/mL e vellosiminol (Quadro 1:27)- Cl_{50} = 1,04 μ g/mL (MBEUNKUI et al. 2012). Em síntese, a atividade antiplasmódica de *G. vellosii* está relacionada aos alcaloides.

O EEGV (dose de 5000 mg/kg) não alterou de maneira significativa a evolução ponderal dos camundongos em relação ao grupo controle. No estudo anátomo-histopatológico ao final do tratamento agudo, os órgãos analisados (cérebro, coração, fígado, pulmões, baço, pâncreas e rins) não apresentaram quaisquer alterações anatômicas ou particularidades histológicas (SANTOS e VOLPATO, 2015).

Utilizando cérebro de camundongo, avaliou-se a atividade anticolinesterásica da Fração Alcalóidica de *Geissospermum vellosii* (FAGV), observando efeito inibitório dessa enzima (Cl_{50} = 39,3 μ g/mL) e redução da amnésia induzida pela escopolamina (30 mg/kg por via I.P.). De FAGV foi isolado e identificado a geissospermina (24; LIMA et al. 2009), este alcaloide apresentou atividade depressora do Sistema Nervoso Central (AUROUSSEAU, 1960), induziu o relaxamento do musculo esquelético ao inibir receptores nicotínicos (CORRÊA, 1974) e reduziu a atividade locomotora (SHIMADA et al. 1999).

O EEGV e a fração diclorometano (FrCDMGV) e alcaloide 12-metoxi-1-metil-aspidospermidina foram submetidos a avaliação da atividade antinociceptiva através dos modelos da formalina e contorção abdominal. Nesse estudo, tanto o EEGV como FrCDMGV inibiram a dor em nível periférico e central (dose= 30 mg/kg, V.O), porém não provocaram alterações locomotoras significativas. Logo, a atividade antinociceptiva observada pode estar relacionada ao alcaloide 12-metoxi-1-metil-aspidospermidina (Quadro 4:30; dose= 0,001-1 mg/kg), e esse efeito inibitório central da dor relacionado à estimulação dos receptores serotominérgico 5-HT_{1A} (WERNER et al. 2009).

Muitas vezes as atividades antinociceptiva e antiinflamatória estão relacionadas à capacidade antioxidante. A aspidospermina (60 μ g= 38,21%), através do método do fosfomolibdênio apresentou uma capacidade antioxidante 60% menor que a do ácido ascórbico. Porém, aspidospermina (50 e 60 μ g= 123%), apresentou uma capacidade antioxidante superior a rutina (60 μ g= 100%). Pelo método ácido tiobarbitúrico-espécies reativas, utilizando concentrações (100, 500 e 1000 ppm), a aspidospermina (8,10, 10,10 e 34,59%, respectivamente) apresentou a atividade antioxidante semelhante ao butil-hidroxitolueno (BHT - 10,73, 20,25 e 35,16%,

respectivamente) e ácido ascórbico (3,67, 14,87 e 21,73%, respectivamente). Outros ensaios realizados com a aspodospermina (200 µg/mL) tais como enzimas catalase, peroxidase e superóxido dismutase, nos quais houve inibição destas em 2,510U, 4,353µmol de H₂O₂ min⁻¹ mg⁻¹ prot, e 44,933%, respectivamente. A atividade sobre a catalase, peroxidase e superóxido dismutase foi semelhante à do acetato de tocoferol (2,250U, 4,460µmol de H₂O₂ min⁻¹ mg⁻¹ prot, e 49,733%, respectivamente) e ácido ascórbico (1,661U, 1,723µmol de H₂O₂ min⁻¹ mg⁻¹ prot, e 47,267%, respectivamente; DIAS, 2012).

A atividade antioxidante (catalase, peroxidase e superóxido dismutase) da Fração Diclorometânica de *Geissospermum vellosii* (FrDcmGV) foi avaliada, sendo que esta fração (0,151U, 2,483µmol de H₂O₂ min⁻¹ mg⁻¹ prot, e 32,433%, respectivamente) influenciou a peroxidase de forma semelhante ao ácido ascórbico (1,661U, 1,723µmol de H₂O₂ min⁻¹ mg⁻¹ prot, e 47,267%, respectivamente; DIAS, 2012). Esta capacidade antioxidante foi relacionada, também, à presença de sesamina e lupeol, pois estes constituintes são considerados bons oxidantes (NONAKA et al. 1997; CHATURVEDI; BHUI; SHUKLA, 2008; CHUNG et al. 2010).

A aspodospermina, sesamina e F14 (mistura de aspodospermina + sesamina) foram positivos (nas concentrações de 2,5, 5, 10 e 15 µg/mL), ou seja, apresentaram efeito imunomodulador, sendo capazes de estimular os neutrófilos humanos promovendo a liberação de complexos reativos de oxigênio, semelhante ao éster de forbol (Acetato de forbol miristato - PMA). Estas substâncias ativam a proteína quinase C, e o fator nuclear eritróide (Nrf2) que se ligam a elementos de resposta antioxidantes (ARE) induzindo a produção de enzimas antioxidantes. Portanto, acredita-se que as substâncias que estimulam os neutrófilos a liberarem espécies reativas de oxigênio (enzimas superóxido dismutase, ascorbate peroxidase, catalase e polifenoloxidase), ou seja, imunomoduladoras, podem ser estudadas para a utilização em doenças parasitárias e bacterianas, onde a ativação dos neutrófilos para liberação de espécies reativas de oxigênio seja necessária (DIAS, 2012).

Não foi encontrado na literatura estudo com avaliação da atividade antileishmania para espécie *G. vellosii*. Este estudo relata, pela primeira vez, a atividade antileishmania desta espécie. A seguir o Quadro 5, neste encontra-se a síntese dos estudos biológicos já realizados com a espécie.

Quadro 5 - Avaliação biológica de *Geissospermum vellosii*.

Atividade Biológica	Órgão vegetal	Amostra	Atividade comprovada	Referência
Antitumoral	Cascas	Fração alcaloídica	Ativo <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> em câncer de próstata	BEMIS et al. 2009; CHANG et al. 2014
	Não descrito	Extrato hidroalcoólico	Ativo em câncer de ovário	YU e CHEN, 2014
Antimicrobiano	Cascas	Extrato etanólico, frações e aspodospermina	Ativo contra <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>S. typhimurium</i>	DIAS, 2012
		Extrato etanólico e frações	Ativo contra <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> Ativo contra <i>S. aureus</i> Oxacilina Resistente	BRANDÃO, 2012 SARAIVA, 2012
Antiplasmódica	Cascas	Extrato etanólico	Ativo <i>vivo</i> contra <i>P. faciparum</i>	BERTANI et al. 2005
			Ativo contra <i>P. faciparum</i> cloroquina-resistente	MUÑOZ et al. 2000
		Extrato metanólico e alcaloides indólicos	Ativo contra <i>P. faciparum</i> sensíveis a cloroquina	MBEUNKUI et al. 2012
	Extrato etanólico e frações	Ativo <i>in vitro</i> contra <i>P. faciparum</i> cloroquina-resistente	BRANDÃO, 2012	
	Cascas	Extrato etanólico	Ativo <i>in vivo</i> contra <i>P. berghei</i>	SANTOS e VOLPATO, 2015
Anticolinesterásica	Cascas	Extrato etanólico, frações e Geissospermina	Efeito inibitório da colinesterase e redução da amnésia induzida pela escopolamina	LIMA et at. 2009
Antinociceptiva	Cascas	Extrato etanólico, frações e 12-metoxi-1-metil-aspidospermidina	Ativo no modelo de nocicepção induzida por ácido acético	WERNER et al. 2009
Antioxidante	Cascas	Extrato etanólico, frações e substâncias isoladas	Ativo para efeito imunomodulador (ação antioxidante)	DIAS, 2012

2.2.1.2 *Geissospermum sericeum* Miers

A espécie *Geissospermum sericeum* Miers é uma árvore nativa da América do Norte, Guianas e Brasil (FORZZA, 2010; WCSP, 2014). No Brasil é encontrada nas Regiões Norte e Sudeste, ocorrendo nos Estados do Pará, Amapá, Amazonas, Minas Gerais, Espírito Santo e São Paulo (CAMARGOS et al. 2001).

A *G. sericeum* é considerada espécie de floresta não manejada, sendo útil para alimentação de animais e com propriedades medicinais (RIBEIRO et al. 2013). Essa espécie é conhecida como Acariquara Branca e Acariúba-rana, Acari-rana, Pau-forquilha, Pau-pereira, Pereira, Quina-rana (RIBEIRO; COSTA; BARROSO, 1979), Acaririnha (BOTSARIS, 2007) e Quina-quina (VEIGA e SCUDELLER, 2015).

A Quina-quina, por conta de sua casca amarga (semelhante ao alcaloide quinino), é usada para a malária (BRANDÃO et al. 1992) e tratamento da febre no Suriname (MORTON, 1981) e Guiana (FANSHAW, 1948). Além disso, é utilizada na medicina popular para o tratamento de: dermatose, inflamação, Febre-dopântano (Anemia Infeciosa Equina; BOTSARIS, 2007), enxume (corpo inchado), dor ao urinar, alergia (FREITAS e FERNANDES, 2006), tônico digestivo, tratamento de problemas estomacais e vesícula (GONÇALVES, 2010). Chá de *G. sericeum* é utilizado para o tratamento de doenças venéreas, diabetes, diarreia, vermes e coceiras (DEFILIPPS; MAINA; CREPIN, 2004). Ainda há relatos do uso da decocção da casca de *G. sericeum* como abortivo (MILLIKEN, 1997).

Na prospecção fitoquímica do extrato etanólico obtido de cascas de *G. sericeum*, alcaloide, flavonoide, tanino e saponina foram detectados (SAITO et al. 2006). Dos extratos obtidos das cascas de *G. sericeum* foram isolados os seguintes alcaloides: geissospermina (Quadro 1:24, MANSKE e HARRISON, 1965), geissoschizolina (Quadro 1:5), geissoschizolina N⁴-óxido (Quadro 1:20); 1,2 diidrogeissoschizolina (Quadro 1:21) e flavopereirina (Quadro 1:18; STEELE et al. 2002).

Estudos com avaliação antitumoral e antiplasmódico foram encontrados na literatura referente a espécie *G. sericeum* (Quadro 6). Em geral, estas atividades têm sido relacionadas aos alcaloides.

A atividade antitumoral e citotoxicidade de alcaloides β -carbolínicos (alstonina, serpentina, sempereirina e flavopereirina) foram avaliadas em células

tumorais de mama e linhagens não tumorais, respectivamente. O parâmetro utilizado foi a inibição da síntese de DNA nas células tumorais e normais. Os alcaloides interferem nesse processo de iniciação e não no alongamento, sendo esta inibição seletiva para as células tumorais. Os alcaloides ainda inibiram a ligação de esteroides em seus receptores nas células do câncer de mama, porém este efeito inibitório foi revertido pelo o aumento da concentração de esteroides (BELJANSKI e BELJANSKI, 1982).

Em outro estudo, a flavopereirina, diidroflavopereirina e PB-100 (mistura de flavopereirina e diidroflavopereirina) foram submetidos a avaliação da atividade antitumoral, utilizando linhagem de células humana de câncer do: cérebro (U251, CFF-STTG-1, SW 1088, C6), colo (LoVo, CaCo-2), fígado (Sk-hep 1), rim (A 498), pele (G-361), ovário (ES 2, SW 626), mama (ZR-75-1, MCF-7), pâncreas (MIA PaCa2), próstata (PC3) e tireóide (TT). Também utilizaram linhagens de células normais: cérebro (CRL 1656), colo (CCD-18Co), fígado (Clone 9), rim (NRK-49F), pele (CCD-974Sk). A concentração de 100 µg/mL de PB-100 foi a mais ativa com inibição de 80 a 90% entre as diferentes linhagens de células, isto é, PB-100 foi ativo para 16 diferentes linhagens celular tumorais, incluindo as resistentes aos fármacos e não inibiu a multiplicação de células normais (manteve 95% das células normais viáveis). A flavopereirina e diidroflavopereirina mostraram a mesma atividade antitumoral, confirmando a hipótese de que estes dois alcaloides são responsáveis pela atividade de PB-100 (BELJANSKI, 2000).

Quadro 6 - Avaliação biológica de *Geissospermum sericeum*.

Atividade Biológica	Órgão vegetal	Amostra	Atividade comprovada	Referência
Antitumoral	Não descrito	Acaloides β -carbolínicos	Inibição seletiva de DNA em células tumorais de mama	BELJANSKI e BELJANSKI, 1982
	Não descrito	Acaloides β -carbolínicos	Ativo para 16 diferentes linhagens celular de diferentes locais no organismo humano.	BELJANSKI, 2000
Antiplasmódica	Cascas	Extrato aquoso	Inativo contra <i>P. berghei</i>	CARVALHO, 1991
	Cascas	Extrato metanol:água (9:1) e alcaloides	Ativo contra <i>P. falciparum</i>	STEELE et al. 2002

O extrato metanol:água (9:1) de cascas de *G. sericeum* e seus alcaloides geissoschizolina (quadro 1:5), geissoschizolina N⁴-óxido (quadro 1:20), 1,2-diidrogeissoschizolina (quadro 1:21) e flavopereirina (quadro 1:18) foram submetidos à avaliação da atividade antiplasmódica (clone de *Plasmodium falciparum* multidroga resistente K1 e sensível T9-96) e a citotoxicidade. O extrato foi ativo (CI₅₀= 1,78 µM) contra K1, e geissoschizolina e geissoschizolina N⁴-óxido apresentaram baixa seletividade (IS= 1; CI₅₀ e CC₅₀ > 40 µM). A 1,2-diidrogeissoschizolina apresentou maior atividade no clone resistente (K1 - CI₅₀= 27,26 µM; T9-96 - CI₅₀= 35,37 µM) e a flavopereirina foi a mais ativa no *P. falciparum* (K1- CI₅₀= 11,53 µM e T9-96 -CI₅₀= 1,83 µM), porém seu índice de seletividade foi muito baixo para o clone resistente e elevado para o parasito sensível (CC₅₀= 10,7 µM; IS= 0,93 para K1; IS= 5,85 para T9-96; Tabela 1; STEELE et al. 2002).

Os extratos (clorofórmico, etanólico e aquoso liofilizado), obtidos das cascas de *G. sericeum*, foram submetidos à avaliação antimalárica em camundongos infectados com *Plasmodium berghei* (dose= 250, 500 e 1000 mg/kg de peso, por 4 dias consecutivos de tratamento). As parasitemias foram avaliadas no 5^o e 8^o dias, não sendo observadas reduções nas taxas da parasitemia em nenhum extrato e em nenhuma das doses utilizadas (CARVALHO, 1990).

Tabela 1 - Atividade antiplasmódica *in vitro* e citotoxicidade de alcaloides obtidos de *G. sericeum*

Amostras	Atividade plasmódica (CI ₅₀ : µM)		Citotoxicidade (CC ₅₀ : µM)	IS
	K1	T9-96	CC ₅₀	
Extrato ^a	1,78 ± 0,047	nt*	Nt	nd**
Geissoschizolina	> 40	> 40	> 40	nd**
1	> 40	> 40	> 40	nd**
2	27,26 ± 10,9	35,37 ± 2,36	> 40	nd**
Flavopereirina	11,53 ± 0,54	1,83 ± 0,10	10,7 ± 1,45	0,93; 5,85

Fonte: STEELE et al. 2002.

Legenda: CC₅₀ = Concentração citotóxica para 50% das células. a. Extrato: Metanol:água; 1. Geissoschizolina N⁴-óxido; 2. 1,2-diidrogeissoschizolina. *nt = não testada. **nd = não determinado.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Realizar estudos farmacognósticos, fitoquímicos, atividade antileishmania e citotoxicidade de *Geissospermum vellosii* Allemão e *Geissospermum sericeum* Miers.

3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar, em termos farmacognóstico, os pós das plantas;
- Realizar estudos fitoquímicos, visando o isolamento de alcaloides de *Geissospermum vellosii* Allemão e *Geissospermum sericeum* Miers;
- Avaliar a atividade antipromastigota de extratos, frações e substâncias puras frente à *Leishmania (L.) amazonensis*;
- Determinar a citotoxicidade dos extratos, frações e/ou substâncias puras frente à macrófagos e células tumorais hepáticas;
- Determinar o índice de seletividade de extratos, frações e substâncias puras;
- Avaliação o sinergismo entre as substâncias puras e o controle positivo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 EQUIPAMENTOS

- Autoclave - Phoenix;
- Balança analítica - Bioprecisa, modelo FA2104 N Eletronic Balance;
- Banho Maria - SOLAB Científica, modelo SL150;
- Banho de Ultrassom - Tecnal Equipamentos para laboratório, modelo 2210 Branson;
- Cabine de fluxo laminar vertical - Pachane, modelo PA 310;
- Câmara de contagem Neubauer espelhada - Improved;
- Câmara de CO₂ - Insight Pesquisa e Ensino;
- Capela - Quimis;
- Centrifugada refrigerada - Cientec Equipamentos para Laboratório, modelo CT-600R;
- Contador manual de células – DIGETIMER;
- Dessecador de vidro;
- Destilador de água;
- Estufa BOD (Demanda Bioquímica de Oxigênio) - Byosistens Com. Importadora e Exportadora de Equipamentos para Laboratório LTDA, modelo HF212UV;
- Estufa - Medicate Produtos Médicos, modelo MD 1.2;
- Evaporador rotatório - Fisatom;
- Geladeira;
- Incubadora de CO₂ - Ultrasafe, modelo HF212 UV;
- Leitora de Microplacas - Biotek, modelo ELX 808;
- Micropipetas, volume ajustável de 10-100 µL e de 100-1000 µL – Paguepet;
- Microscópio invertido - Zeizz, modelo Axiovert 25;

- Microscópio óptico Eclipse, modelo E200 - NIKON;
- Sistema de filtração à vácuo 250 mL, membrana 0,22 µm- TPP-Switzerland.

4.1.2. SOLVENTES

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

4.1.3 FASES ESTACIONÁRIAS

- Coluna de fase reversa RP 18 (5 µM) 12,5 cm LiChrocart 125-4 (Meck Millipore[®]);
- Sílica gel 60 para cromatografia de camada delgada Flash (Merck);
- Sephadex LH-20.

4.1.4 MATERIAIS PLÁSTICOS, DE METAL E DE VIDRO

- Cuba cromatográfica;
- Espátulas de metal;
- Espalhador;

- Estantes plásticas;
- Garrafas para cultura de células 75 cm² - TPP-Switzerland;
- Garrafas para cultura de células 25 cm² - SPL Life Sciences;
- Lamínula 13 mm circular G13C - Glasscyto;
- Placas de cultura de células de 24 poços com tampa - TPP;
- Placas de cultura de células de 96 poços, fundo chato com tampa - TPP;
- Placas preparativas - tamanho 20 x 20 cm;
- Ponteira 200 µl amarela, tipo universal - Labware Manufacturing CO;
- Ponteira 100-1000 µl, azul, tipo universal - Kartell SPA;
- Tubo cônico graduado 15 mL não estéril (Tipo Falcon);
- Tubo cônico graduado 50 mL estéril (Tipo Falcon) - Becton-Dicknson;
- Tubos de microcentrifuga (Tubos eppendorf) de 1,5 mL - Kartell SPA;
- Suporte de ferro.

4.1.5 VIDRARIAS

- Balão volumétrico de 500 e 1000 mL - Laborquimi;
- Bastão de vidro;
- Becker de 600 e 1000 mL - Satelit;
- Erlenmeyes de 250 e 2000 mL - Vidrolabor;
- Funil de separação de 100 mL - Schott Duran;
- Pipetas de vidro graduadas de 1 mL, 5 mL e 10 mL - Vidrolabor;
- Proveta de 250, 500 e 1000 mL - Vidrolex;
- Balões de fundo redondo de 100, 250 e 500 mL;
- Bastão de vidro;
- Béqueres de 10, 50, 100, 500 e 1000 mL;
- Coluna cromatográfica de vidro 100 x 2,5 cm;
- Condensador em bolas;
- Cubas cromatográficas;
- Erlenmeyers de 50, 100, 250 e 500 mL;
- Espátulas de metal;

- Frascos Eppendorf - Sigma Chemical Company;
- Frascos de penicilina 50 mL;
- Funis de separação de 250 mL e 2000 mL;
- Membranas filtrantes Millipore, Millex F6 0,2 mm;
- Papel alumínio comercial;
- Papel de filtro MN 618;
- Pipetas de Pasteur de vidro;
- Pipetas volumétricas de 10 e 20 mL;
- Tubos vials para CLAE.

4.1.6 MEIO DE CULTURA E OUTROS

- Anfotericina B 50 mg sol. inj. - Cristália produtos farmacêuticos;
- Bicarbonato de sódio - Sigma-Aldrich;
- Cloreto de sódio P.A - Cromoline química fina Ltda;
- Corante Azul de Tripán em solução (0,4%/100 mL) testado para cultura de célula- Sigma-Aldrich;
- Corante Giemsa - Dinâmica química contemporânea Ltda;
- Forbol-12-miristato-13-acetato, PMA;
- Fosfato de sódio monobásico anidro P.A - Labsynth produtos para laboratório;
- Fosfato de sódio dibásico anidro P.A - Labsynth produtos para laboratório;
- Gentamicin (Sulfato de gentamicina) 80 mg/2mL solução injetável - NovaFarma Indústria Farmacêutica LTDA;
- Infusão de Agar base para Agar sangue - Becton Dickinson Ltda;
- Meio Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640) com glutamina e 25 MM HEPES, isento de bicarbonato de sódio - Sigma-Aldrich;
- Bicarbonato de sódio - Sigma Aldrich;
- Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium (MTT, 500 mg) - Sigma-Aldrich;
- Penicilina G - Sigma Aldrich;
- Soro bovino Fetal - Gibco®.

4.1.7 REVELADORES PARA CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)

4.1.7.1 Reagente Dragendorff

Solução A: 0,850 g de subnitrato de bismuto, 10,0 mL de ácido acético e 40,0 mL de água destilada. Solução B: 8,0 g de iodeto de potássio em 20,0 mL de água destilada. As soluções foram combinadas, na proporção de 1:1, resultando numa solução estoque. Para pulverização nas placas cromatográficas diluiu-se 2,0 mL de solução estoque com 4,0 mL de ácido acético glacial e 20,0 mL de água destilada (WAGNER; BLADT; ZGAINSKI, 1984).

4.1.8 PREPARO DOS MEIOS DE CULTIVO

4.1.8.1 Meio RPMI 1640 (com L-Glutamina e sem Bicarbonato de sódio) incompleto e meio completo

O meio foi preparado com 800 mL de água ultrapura (Milli-Q®) em constante agitação. Em seguida, adicionou-se bicarbonato de sódio (2 g), D-glicose (2 g; dextrose), tampão HEPES (5,98 g), RPMI 1640 (10,4 g) em pó e completou-se com água ultrapura até o volume de 1000 mL. Logo após, ajustou-se o pH do meio (pH= 7,2). O meio foi esterilizado em membrana de 0,22 µm e acondicionado em frascos estéreis a 4 °C. Para a confecção de 40 mL do meio RPMI completo foram adicionados 4 mL de soro fetal bovino desnaturado (56 °C/20 min) e 0,4 mL de uma solução de antibiótico (Penicilina-Estreptomicina, líquido - 10.000 U/mL de penicilina + 10.000 µg/mL de estreptomicina, Gibco®), previamente preparada. O preparo deste meio segue o Protocolo Experimental do Instituto Evandro Chagas (IEC/SVS/MS).

4.1.9 MATERIAL BIOLÓGICO

4.1.9.1 Espécie de *Leishmania*

O parasito utilizado foi *Leishmania (L.) amazonensis* (concedido pelo IEC/SVS/MS) isolado de caso humano procedentes de Ulianópolis, Estado do Pará (Quadro 7).

Quadro 7 - Designação da cepa de *Leishmania* utilizada no estudo.

Registro	Espécie	Origem geográfica
MHOM/BR/2009/M26361	<i>Leishmania (L.) amazonensis</i>	Ulianópolis – PA

4.1.9.2 Linhagem Celular

Para os testes de viabilidade celular (método MTT) foram utilizadas a linhagem celular de leucemia monocítica aguda humana (THP-1; ATCC nº. TIB 202) e uma linhagem celular permanente HepG2, oriunda de fígado humano, ambas adquiridas do acervo do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ).

4.1.10 MATERIAL VEGETAL

As cascas de *Geissospermum vellosii* Allemão foram coletadas em área de terra firme, no dia 13 de dezembro de 2012, vila do Anani, município de Peixe-boi, Estado do Pará, cuja exsicata consta com o registro MG-Etn-00245.

As cascas de *Geissospermum sericeum* Miens foram coletadas no dia 26 de abril de 2013, período da manhã, na região de Volta Grande do Xingu, em Belo Monte, Terra do Meio, Serra do Pardo, município de Altamira, Estado do Pará, nas

coordenadas S 41°10'86" W 41°53'51,6".

As espécies foram identificadas pela Dra. Márlia Regina Coelho Ferreira e encontram-se depositadas no Museu Paraense Emílio Goeldi (João Murça Pires).

4.2. Métodos

4.2.1 ESTUDO FARMACOGNÓSTICO

4.2.1.1 Análise granulométrica

A amostra de 25 g do pó seco do material vegetal foi colocada sobre um conjunto de tamises de malhas de abertura nominal 1,70 mm, 710 µm, 355 µm, 250 µm, 180 µm, 125 µm, provido de tampa e fundo coletor. O conjunto de tamises foi colocado em tamisador vibratório e submetido à passagem forçada por vibração na escala 6,5 do aparelho durante 15 minutos e, em seguida, as frações recolhidas dos tamises e do fundo coletor foram pesadas conforme metodologia da Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010b). Este procedimento foi realizado em triplicata.

4.2.1.2 Determinação da densidade bruta

Para determinação da densidade bruta foi utilizado o método da proveta, onde o pó do material vegetal foi transferido para uma proveta de 25 mL, com peso conhecido, até completar o volume de 15 mL. Durante a transferência do pó para a proveta, foram feitos movimentos visando à remoção de ar entre as partículas. Em seguida, a proveta contendo o pó foi pesada, e pela diferença de pesos, foi obtido o peso de pó contido na proveta. A densidade foi calculada através da relação entre peso do pó e o volume (15 mL) de acordo com os procedimentos de Lachman, Lieberman e Kanig (2001). As determinações foram realizadas em triplicata.

4.2.1.3 Determinação da perda por dessecação (teor de água)

A amostra de 2 g do material vegetal foi transferida para um pesa-filtro chato dessecado, nas mesmas condições do teste a ser realizado, até peso constante. O pesa-filtro contendo a amostra foi pesado e tampado. Em seguida, agitado para uniformizar a amostra. O pesa-filtro foi colocado destampado juntamente com a tampa na estufa. A amostra foi secada a 105-110 °C, primeiramente por cinco horas, e depois, de hora em hora, até peso constante, ou seja, diferença entre pesagens menores do que 0,5 mg, conforme Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010b). O resultado foi expresso pela média de três determinações.

4.2.1.4 Determinação do teor de cinzas totais

A amostra de 3 g do material vegetal foi transferida para um cadinho de porcelana, previamente calcinado a 450 °C em forno mufla, estabilizado sob as mesmas condições do teste. O material foi uniformizado no cadinho e submetido à calcinação por uma hora, resfriado em dessecador por 30 minutos e pesado em balança analítica. Este procedimento foi repetido até a diferença de peso entre duas pesagens consecutivas não ultrapassar 0,5 mg, conforme Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010b). As determinações foram realizadas em triplicata.

4.2.1.5 Determinação do pH

Uma solução a 1% (p/v) do pó do material vegetal em água destilada foram aquecidos até ebulição em chapa-elétrica por 5 minutos, seguida de filtração à quente em papel filtro; após resfriamento, as medidas de pH foram obtidas através de potenciômetro previamente calibrado (BRASIL, 2010b). Os resultados foram obtidos pela média de três determinações.

4.2.1.6 Índice de espuma

A amostra de 2 g do pó vegetal foi transferida para um erlenmeyer contendo 50 mL de água fervente. A mistura foi fervida por 30 minutos. Após resfriamento, o resíduo foi separado por filtração e a solução resultante transferida para um balão volumétrico de 100 mL. A extração do mesmo material foi repetida utilizando porções sucessivas de 10 mL de água fervente até completar o volume de 100 mL. O decocto foi distribuído em 10 tubos de ensaio com tampa (1,6 cm de diâmetro x 15 cm de altura), em uma série sucessiva de 1, 2, 3, até 10 mL, o volume de cada tubo foi ajustado com água destilada até completar 10 mL. Os tubos foram agitados e deixados em repouso por 15 minutos, para então, as medidas da altura da espuma de cada tubo serem analisadas (BRASIL, 2010b). Este procedimento foi realizado em triplicata.

4.2.2 ESTUDOS FITOQUÍMICOS

As cascas de *G. vellosii* e *G. sericeum* foram lavadas em água corrente e mergulhadas em álcool 70% para retirada de impurezas e, posteriormente, secas em estufa com ventilação a ar forçado por 7 dias. Em seguida, triturou-se o material em moinho de facas, obtendo-se o pó das cascas do qual foi preparado o extrato etanólico. Os extratos etanólicos (EEGV e EEGS) foram obtidos por maceração exaustiva, sendo recolhida a solução extrativa a cada 24h (8 dias consecutivos, com volume final de 16L). Essa solução foi concentrada até resíduo em rotaevaporador (T= 40-45 °C), o resíduo foi seco em estufa a 40 °C até peso constante.

Para o fracionamento dos extratos utilizou-se as seguintes metodologias: re-extração sob refluxo, partição ácido-base e coluna cromatográfica aberta.

Na metodologia de re-extração sob refluxo, os extratos etanólicos foram submetidos a um sistema de refluxo e solventes de polaridades crescentes (hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol). O extrato etanólico (5 g) foi colocado em balão de fundo redondo, acrescentado o solvente (100 mL) e aquecendo-o (40 °C) sob refluxo por 20 minutos. O procedimento foi repetido por 3 vezes em cada

solvente (VALE et al. 2015; Figura 4), obtendo-se as seguintes frações (FrHex; FrDcm; FrACoET; FrMeOH) de ambas as espécies (Tabela 2).

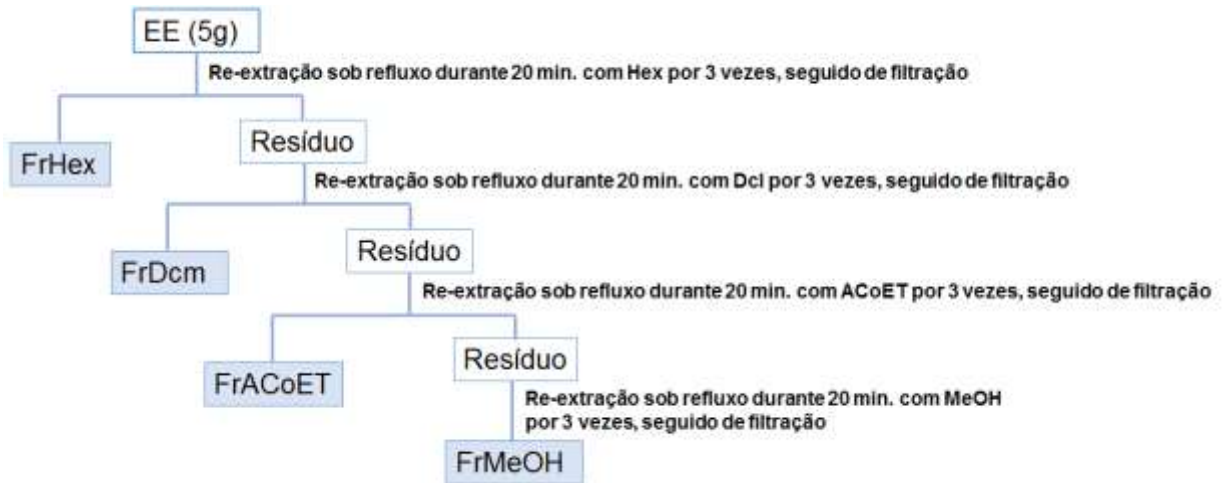


Figura 4 - Fracionamento sob refluxo dos extratos etanólicos de cascas de *G. vellosii* e *G. sericeum*.
Legenda: Hex- Hexano; Dcl-Dicloro metano; ACoET- Acetato de etila; MeOH-Metanol; EE-extrato etanólico; FrHex- fração hexânica do extrato etanólico; FrDCM- fração diclorometânica do extrato etanólico; FrAcOET- fração acetato de etila do extrato etanólico; FrMeOH- fração metanólica do extrato etanólico.

A segunda estratégia de fracionamento utilizada foi a partição ácido-base. Os extratos etanólicos (EEGV e EEGS) foram solubilizados em álcool etílico (10 mL), então, adicionou-se solução de HCL (3%v/v) até pH 3,0, seguido de diclorometano (cerca de 250 mL x 3 vezes), e então recolheu-se a Fração de Neutros. Na solução aquosa ácida foi adicionado hidróxido de amônio até pH 9,0. Depois, adicionou-se diclorometano (250 mL x 3 vezes), em seguida coletou-se a Fração Alcaloídica (Figura 5; Tabela 2).

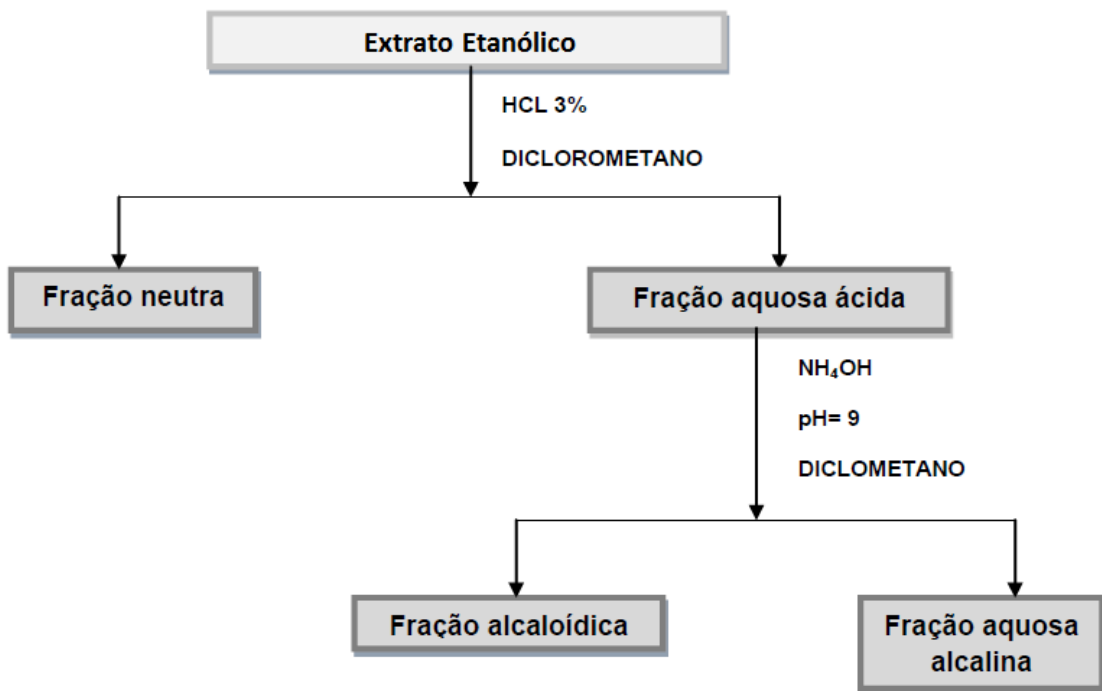


Figura 5 - Partição ácido-base dos extratos etanólicos de *G. vellosii* e *G. sericeum*.

Tabela 2 - Massa das amostras obtidas de *G. vellosii* e *G. sericeum*.

Amostras	Massa	Amostras	Massa
EEGV	10,13 g	EEGS	10,99 g
FrHexGV	0,09 g	FrHexGS	0,21 g
FrDcmGV	0,29 g	FrDcmGS	0,212 g
FrAcOETGV	0,11 g	FrAcOETGS	0,06 g
FrMeOHGV	4,85 g	FrMeOHGS	3,53 g
FAGV	2,14 g	FAGS	0,87 g
FNGV	1,37 g	FNGS	0,54 g

Legenda: GV: *Geissospermum vellosii*; GS: *Geissospermum sericeum*; EE: Extrato Etanólico; FrHex: Fração Hexânica; FrDcm: Fração Diclorometânica; FrAcOET: Fração Acetato de Etila; FrMeOH: Fração Metanólica; FA: Fração Alcaloídica; FN: Fração de Neutro.

Visando o isolamento de alcaloides, as frações alcaloídicas (FAGV e FAGS) foram submetidas ao fracionamento em coluna cromatográfica aberta (dimensões: 30 cm de altura por 1,5 cm de diâmetro), utilizando como fase estacionária Sephadex LH-20 e fase móvel o metanol. As frações FAGV e FAGS (1,6858 g e 1,4015 g, respectivamente) foram eluídas originando as subfrações de 80-100 mL descritas na Tabela 3. Extratos, frações e subfrações foram avaliadas por Cromatografia em Camada Delgada (CCD), tendo reagente de Dragendorff e UV (365 nm) como revedores.

Tabela 3 - Rendimentos das subfrações de *G. vellosii* e *G. sericeum* obtidas por coluna de Sephadex.

Subfração FAGV	Peso (mg)	Subfração FAGS	Peso (mg)
F1FAGV	7,0	F1FAGS	0,0
F2FAGV	9,6	F2FAGS	81,6
F3FAGV	36,1	F3FAGS	70,1
F4FAGV	80,3	F4FAGS	112,5
F5FAGV	547,3	F5FAGS	61,7
F6FAGV	455,9	F6FAGS	489,7
F7FAGV	46,3	F7FAGS	153,7
F8FAGV	17,4	F8FAGS	23,9
F9FAGV	72,2	F9FAGS	7,8
F10FAGV	28,3	F10FAGS	7,8
F11FAGV	31,3	F11FAGS	88,1
F12FAGV	23,2	F12FAGS	88,5
F13FAGV	16,8	F13FAGS	86,0
F14FAGV	20,3	F14FAGS	7,3
F15FAGV	27,2	F15FAGS	84,3
F16FAGV	23,8	F16FAGS	4,6
F17FAGV	194,0	F17FAGS	2,3
F18FAGV	20,4	F18FAGS	8,9
F19FAGV	12,9	-	-
F20FAGV	47,2	-	-
F21FAGV	17,0	-	-
F22FAGV	14,4	-	-
F23FAGV	12,9	-	-
F24FAGV	11,4	-	-

Legenda: GV: *Geissospermum vellosii*; GS: *Geissospermum sericeum*; FAGV ou FAGS - Fração Alcaloídica; F1FAGV ou F1FAGS - SubFração 1 da Fração Alcaloídica.

4.2.2.1. Caracterização dos extratos e frações

Os extratos etanólicos (EEGV e EEGS), as frações (FAGV e FNGV; FAGS e FNGS) e subfrações (F6FAGV e F6FAGS), foram analisadas em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a um Detector de Arraço de Diodos (CLAE-DAD).

As amostras (1 mg) foram solubilizadas em metanol grau CLAE (1 mL) sob sonicação. Em seguida, apenas os extratos foram filtrados em cartucho SPE fase C18 para redução da pigmentação, depois disso, todas as amostras (1 mL) foram transferidas para frasco de CLAE (vial). Para realização das análises em CLAE utilizou-se coluna SunFire™ C18 (5 µm; 4 6x150 mm), fluxo de 1 mL, temperatura de eluição de 16-18 °C, tempo de eluição de 15 min. e as leituras foram realizadas na faixa de comprimentos de onda de 212-600 nm, registrando-se cromatogramas nos comprimentos de onda de 212, 254, 340 e 420 nm para todas as amostras. A eluição foi realizada em sistema isocrático de água (A) e acetonitrila (B; Tabela 4).

Tabela 4 – Sistema de eluição empregado nas análises por CLAE-DAD.

TEMPO (min.)	Fluxo (mL/min.)	Eluente A (%)	Eluente B (%)
0	1	80	20
15	1	80	20

Legenda: Eluente A: água; eluente B: acetonitrila.

A partir das análises de CCD e CLAE-DAD, as subfrações 6 (F6FAGV e F6FAGS) foram selecionadas para fracionamento em Cromatografia Líquida de Alta Eficiente semipreparativa (CLAE-DAD semiprep.).

As amostras (100 mg) foram solubilizadas em metanol grau CLAE (2 mL) sob sonicação. Em seguida, apenas 500 µL do diluído foram injetados. Para realização das análises em CLAE-DAD semiprep., utilizou-se coluna SunFire™ Prep. C18 OBD™ (5 µm; 19x150 mm), fluxo de 10 mL, temperatura de eluição de 16-19 °C, tempo de eluição de 10 min., com coletas realizadas de acordo com a faixa de comprimento de onda de 325 nm, registrando-se cromatogramas nos comprimentos de onda de 212, 254, 340 e 420 nm para todas as amostras. A eluição foi realizada em sistema isocrático de água (A) e acetonitrila (B; Tabela 5).

Tabela 5 – Sistema de eluição empregado nas análises por CLAE-DAD semipreparativa.

TEMPO (min.)	Fluxo (mL/min.)	Eluente A (%)	Eluente B (%)
0	10	80	20
10	10	80	20

Legenda: Eluente A: água; eluente B: acetonitrila.

As subfrações foram analisadas em CLAE-DAD, em seguida foram selecionadas as subfrações (F3F6FAGV; F4F6FAGV; F3F6FAGS e F7F6FAGS) para análise em espectrometria de Massa (LC-MS) e em Ressonância Magnética Nuclear (RMN).

As análises em LC-MS (WATER® ACQUITY TQD SYSTEM/ESI), utilizaram 1 mg das amostras, solubilizadas em metanol grau CLAE (1 mL), sob sonicação por 5 minutos. As condições cromatográficas adotadas foram: coluna de fase reversa CSH130 C18, detecção Triplo Quadrupolo (TQD), forno da coluna a 40 °C, utilizando diferentes solventes (metanol, acetonitrila, H₂O 0,1% ácido fórmico. Na obtenção do espectro de massas empregou-se um sistema de Ionização por Spray de Elétrons (ESI), com voltagem do capilar (3), voltagem do cone (30-35) e energia de colisão de (23-32), como modo positivo de elétron spray, analisados de acordo com perfil dos metabólitos isolados.

Para identificação das substâncias isoladas foi utilizado método espectroscópico de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e Carbono 13 (RMN ¹H e C¹³), 1D e 2D. No caso do ¹H RMN, a análise foi feita a 25 °C, utilizando-se o Tetrametilsilano (TMS) como referência interna. Foi utilizado o metanol deuterado para solubilizar as amostras.

O esquema das etapas fitoquímicas para compreensão da realização dos ensaios biológicos estão descritas na Figura 8.

4.2.3 AVALIAÇÃO BIOLÓGICA

4.2.3.1. Atividade antileishmania

4.2.3.1.1. *Cultivo e manutenção das formas promastigotas de Leishmania*

A forma promastigota da espécie *L. (L.) amazonensis* foi cultivada em meio de cultivo *Novy-Nicolle-Mcneal* (NNN). Os parasitos (100 µL) foram transferidos para o meio de crescimento RPMI 1640 (5,0 mL), mantido a 25 °C ± 1 °C. A avaliação do

desenvolvimento e multiplicação das formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* foi realizada através de curvas de crescimento adaptada para microscópio binocular. Esta curva consiste na quantificação de formas promastigotas realizada em câmara hemocitométrica de Neubauer. Para a realização da contagem, foram retirados 10 µL da suspensão de promastigotas e a parte da câmara utilizada para contagem dos parasitos é a mesma utilizada na contagem de leucócitos, com o auxílio de microscópio óptico em aumento de 40X. Na contagem, rosetas ou emaranhados não foram incluídos. Os quatro quadrantes foram contados e calculados a média (URDAPILLETA, 2006). O número de parasitos foi quantificado em intervalos de 24 horas por dez dias consecutivos, e a contagem quase sempre foi realizada no mesmo horário.

Após a determinação da curva, estabeleceu-se que seriam realizadas passagens semanais. Nas passagens posteriores partiu-se da suspensão de promastigotas em meio RPMI, realizando-se uma diluição 1:9 (suspensão de promastigotas: meio RPMI completo), mantendo-se o cultivo na mesma condição de temperatura citada anteriormente.

4.2.3.1.2. *Ensaio da Atividade Antipromastigota*

Cultivos contendo forma promastigota de *L. (L.) amazonensis*, durante a fase logarítmica de crescimento, foram centrifugados (3500 rpm/ 10 minutos). O “pellet” foi ressuspendido em meio RPMI completo, as promastigotas quantificadas em câmara de Neubauer e ajustadas para uma concentração correspondente a 5×10^6 parasitos/100 µL. Esta suspensão foi distribuída em placas de cultura de células com fundo chato pré-dosificadas (100 µL/poço). Na Figura 6, encontra-se detalhada as concentrações utilizadas do extrato, frações, subfrações, substância pura e/ou em associação (sinergismo, proporção de 1:1 entre substâncias puras e/ou associadas com a anfotericina B; 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125 µg/mL), dos controles negativos (controle do solvente: MeOH evaporado + suspensão do parasito + meio) e do controle positivo (Anfotericina B: 25; 12,5; 6,25; 3,125, 1,5625 e 0,7812 µg/mL). As placas foram incubadas (26 °C/24 h).

































































































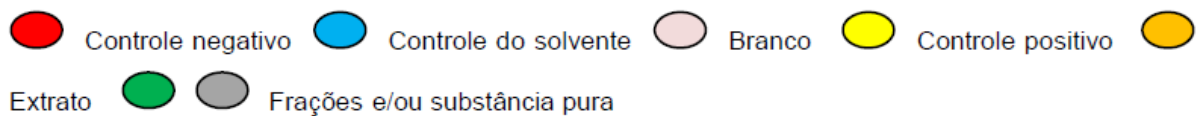
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Figura 6 – Modelo esquemático das placas de 96 poços de fundo chato e da distribuição das substâncias testadas que estão representadas por cores.

Legenda:



Após o período de incubação, foram adicionados 10 µL de 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-brometo de tetrazólio (MTT, 5 mg/mL) em cada poço. A placa foi recoberta com papel alumínio, sucedendo-se nova incubação por 4 h em estufa à 26 °C para que o MTT seja metabolizado e, conseqüentemente, fossem formados os cristais de formazan. Desse modo, a produção de formazan pela atividade de succinato desidrogenase mitocondrial reflete a proporção de células vivas em processo de estresse oxidativo causado pelos fármacos em teste. Após 4 h, foi adicionado 10 µL de dimetilsulfóxido (DMSO), para solubilizar os cristais de formazan gerados, através de agitação manual por 5 min. Em seguida, realizou-se a leitura da densidade óptica das amostras em leitor de placas de ELISA sob comprimento de onda de 490 nm. A viabilidade da forma promastigota foi avaliada com base no metabolismo do MTT, sendo a mesma proporcional ao valor da absorbância gerada. A porcentagem de células viáveis (promastigota) foi calculada pela seguinte fórmula, adaptada de Ngure et al. (2009):

$$\% \text{ viabilidade} = \frac{\text{abs. dos poços com amostra} - \text{abs. dos reagentes (branco)}}{\text{abs. dos poços sem amostra} - \text{abs. dos reagentes (branco)}} \times 100$$

Abs = absorbância

A Concentração Inibitória 50% (CI₅₀) é a concentração que causa a redução de 50% das células em crescimento (viáveis) e foi determinada pelo programa GraphPad Prism versão 6.0 através da leitura realizada em leitor de placas de ELISA, adotando-se os seguintes critérios Mota et al. (2015; Quadro 8):

Quadro 8 - Interpretação dos resultados da avaliação anti-promastigota.

CI ₅₀ µg/mL	Resultados
Menor ou igual a 100 Entre 101-200 Acima de 200	Ativo Moderadamente ativo Inativo

Fonte: MOTA et al. 2015.

4.2.3.1.3 Conversão dos monócitos em macrófagos

Inicialmente as células THP-1 (10 min./1.200 rpm) foram centrifugadas. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado e o “*pellet*” ressuspensionado em 1 mL de Soro Bovino Fetal (SBF) para ajustar a concentração 2-4 x 10⁵ células/poço (monócito). Após cálculo da concentração, adicionou-se meio RPMI 1640 (já com forbol-PMA, na concentração de 200 nmol/L) completo. Depois disso, foi realizada distribuição do ressuspensionado em placas para cultura de células de 96 poços de fundo chato, 100 µL por poços. As placas foram incubadas a 37 °C em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ durante 3 dias para promover a diferenciação das células THP-1 de monócitos para macrófagos. O protocolo de diferenciação foi adaptado de Daigneault et al. (2010). Após o período de incubação, as culturas foram visualizadas em microscópio invertido para observação dos macrófagos aderidos e os poços lavados 3 vezes com meio RPMI 1640 (37 °C) para remover possíveis células não aderentes (TEMPONE et al. 2004).

4.2.3.1.4 *Cultivo e manutenção das linhagens celulares*

As células THP-1 foram cultivadas em garrafas (75 cm²), em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de SBF, 100 µg/mL de estreptomicina e 60 µg/mL de penicilina. Esta linhagem foi cultivada em garrafas de cultura, armazenadas em incubadora de gás CO₂ à 37 °C em atmosfera úmida com 5 % de CO₂.

4.2.3.1.5 *Ensaio de viabilidade celular (método MTT)*

O ensaio de viabilidade celular foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Mosmann et al. (1983). A suspensão de macrófagos foi ajustada para $2-4 \times 10^5$ macrófagos por poço em um volume final de 100 µL de meio RPMI 1640 (com éster de forbol - Forbol-12-miristato-13-acetato, PMA) completo e distribuída em placas para cultura de células de 96 poços de fundo chato. As placas foram incubadas à 37 °C em estufa com atmosfera de 5 % de CO₂ durante duas horas para aderência dos macrófagos aos poços. Após o período de incubação, as culturas foram visualizadas em microscópio invertido para observação dos macrófagos aderidos e os poços lavados 3 vezes com meio RPMI 1640 (37 °C) para remover possíveis células não aderentes (TEMPONE et al. 2004). Após as lavagens as placas foram incubadas na presença dos extratos, frações; substâncias puras e/ou em associação (sinergismo, proporção de 1:1 entre substâncias puras e/ou associadas com a anfotericina B) nas seguintes concentrações: 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,625 e 7,8125 µg/mL.

Em seguida, as placas foram incubadas a 37 °C com atmosfera de 5 % de CO₂ por 24h, 48h e 72h. O controle negativo consiste em suspensão de macrófagos e meio de cultura, o controle do solvente (propilenoglicol + suspensão de macrófago + meio) e o controle positivo consistiu de uma suspensão de macrófago contendo Anfotericina B (100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125 e 1,562 µg/mL).

Após o período de incubação foi adicionado 10 µL da solução brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio - MTT, 5mg/mL; Figura 7) em cada poço (para 100 µL de meio contido nos poços), a placa foi protegida da luz, sucedendo-se

nova incubação por 4 h em estufa a 37 °C. Após esse tempo, o sobrenadante foi então desprezado e adicionou-se 100 µL de DMSO (dimetilsulfóxido) a todos os poços. Em seguida, as placas foram homogeneizadas para a completa dissolução dos cristais de formazan. Após aproximadamente 1 hora, as absorbâncias dos poços foram lidas em um espectrofotômetro de varredura de múltiplos poços, utilizando um comprimento de onda de referência de 570 nm.

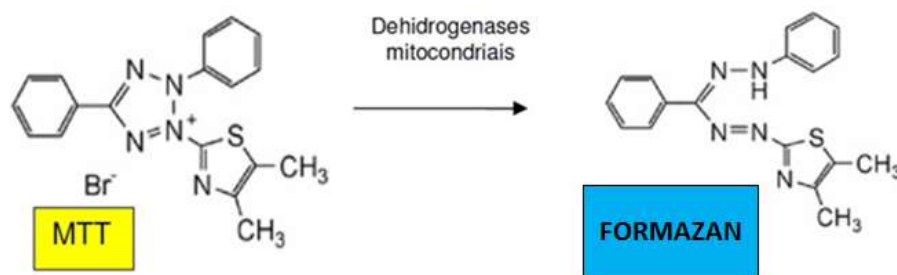


Figura 7- Redução do MTT por enzimas mitocondriais.
Fonte: GOMES, 2008.

Os valores da concentração citotóxica 50% (CC₅₀) foram calculados utilizando-se curvas de dose-resposta a partir de três experimentos independentes. Para o cálculo da viabilidade celular, foi realizada a (Equação 1; GALUCIO, 2014):

$$\% \text{células vivas} = \frac{\text{Absorbância das células}}{\text{Absorbância das células sem tratamento}} \times 100 \quad (1)$$

Ou seja, para o cálculo das células mortas (Equação 2):

$$\% \text{células mortas} = \frac{\text{Absor. céls sem tratamento} - \text{absor. Céls tratadas}}{\text{Absorbância das células sem tratamento}} \times 100 \quad (2)$$

A CC₅₀ foi determinada por regressão linear (programa GraphPad Prism versão 6.0) e classificada em citotóxico, moderadamente citotóxico e inativo (Quadro 9).

Quadro 9 - Interpretação dos resultados da citotoxicidade.

CC ₅₀ µg/mL	Resultados
Menor ou igual a 100	Citotóxico
Entre 101-500	Moderadamente citotóxico
Acima de 500	Não citotóxico

4.2.3.1.6 Índice de Seletividade (IS)

O Índice de Seletividade representa o grau de segurança para a utilização de uma amostra em teste *in vitro* (ABRANTES, 2006), então para determinar a seletividade das amostras com atividade leishmanicida em linhagens celulares, determinou-se o IS dos mesmos, pela seguinte expressão adaptada de Reimão (2009):

$$IS = \frac{CC_{50} \text{ em linhagem celular}}{CI_{50} \text{ contra o parasito}}$$

Para interpretação dos resultados, considerou-se que um IS superior a 1 indica que o composto em estudo apresenta toxicidade maior para o parasito do que para o macrófago. Já um IS menor que 1 indica que o composto apresenta maior toxicidade para o macrófago do que para o parasito. Assim, quanto maior o valor numérico do IS, mais seletivo é o composto em estudo, ou seja, pouco tóxico para o macrófago e ativo contra o parasito (REIMÃO, 2009). Neste estudo serão consideradas promissoras as amostras com $IS \geq 10$.

4.2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As medidas obtidas em cada experimento foram comparadas pelo teste T de "Student" utilizando o programa BioEstat 5.0, com nível de confiança de 95% e nível de significância $\alpha = 5\%$ ($p < 0,05$). Para o cálculo da CI_{50} e da CC_{50} utilizou-se o programa GraphPad Prism versão 6.0.

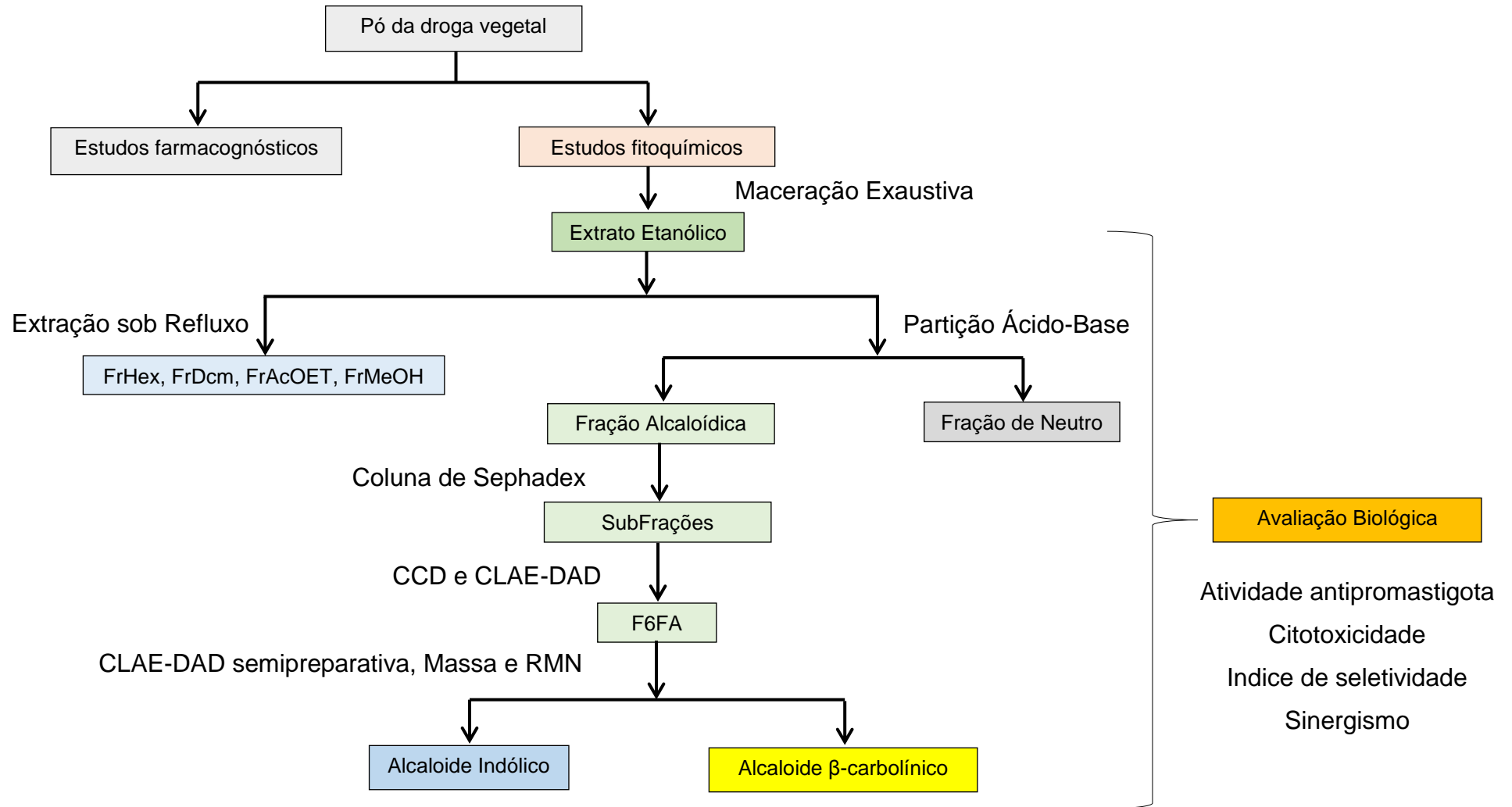


Figura 8 - Esquema do trabalho desenvolvido neste estudo.

Legenda: FrHex: Fração Hexânica; FrDcm: Fração Diclorometânica; FrAcOET: Fração Acetato de Etila; FrMeOH: Fração Metanólica; F6FA: Subfração 6 da Fração Alcaloídica; CCD: Cromatografia em Camada Delgada; CLAE-DAD: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a um Dector de Arranjo de Diodos; RMN- Ressonância Magnética Nuclear.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Devido à importância do gênero *Geissospermum* para a medicina tradicional Amazônica, optou-se por trabalhar com duas espécies, *G. sericeum* e *G. vellosii*. O material vegetal foi submetido aos estudos farmacognósticos, fracionamento biomonitorado, atividade antileishmania e ensaios de citotoxicidade (Figura 8). Os resultados serão descritos e discutidos paralelamente.

5.1. Farmacognóstico

Os pós obtidos das cascas de *G. sericeum* e *G. vellosii* foram submetidos a estudos de granulometria, densidade, perda por dessecação, pH e cinzas totais (Brasil, 2010b). Tendo em vista a vasta utilização destas espécies na medicina popular, o estudo de parâmetros farmacognósticos é importante porque podem permitir a identificação do material vegetal e garantir o controle de qualidade das mesmas (RODRIGUES et al. 2015). Além disso, no estudo fitoquímico, a avaliação farmacognóstica é a primeira etapa, e certamente a mais importante, antes de se realizar a extração dos metabolitos secundários de interesse de uma matriz complexa (COSTA, 1994; BANDEIRA, 2004). Logo, antes de executar uma extração, deve-se levar em consideração uma série de fatores que possam interferir nesta operação tais como granulometria, pH (SOARES et al. 1998), densidade, perda por dessecação, teor de cinzas totais e índice de espuma (BRASIL, 2010b).

De acordo com a Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010b), o pó da *G. vellosii* pode ser considerado grosso, pois menos de 40% das partículas passaram pelo tamis com abertura nominal de malha de 355 µm, porém o pó obtido das cascas de *G. sericeum* foi considerado muito grosso devido grande acúmulo de partículas na malha de 1,7 mm (Tabela 6). A obtenção destes diâmetros pode estar relacionada ao tipo de moinho e à consistência das cascas secas, o qual dificulta a moagem e, conseqüentemente, à obtenção de partículas menores. O material vegetal pulverizado que apresente partículas de tamanho superior à classificação de fino é

mais adequado para os processos de extração, principalmente, por percolação ou maceração exaustiva, pois a presença de pó fino pode favorecer o entupimento do percolador (LIST e SCHIMIDT, 2000). Além disso, a elevada espessura do pó favorece sua conservação, pois quanto mais pulverizado, menor será o seu tempo de vida útil, em razão do aumento da superfície de contato dos grãos, que possibilita eventuais problemas de estabilidade devido à adsorção de umidade (AMARANTE, 2010). A Figura 9 mostra o aspecto do pó obtido das cascas de *G. vellosii* e *G. sericeum*.

Tabela 6 - Análise granulométrica das cascas de *G. vellosii* e *G. sericeum*.

Abertura nominal da malha	Média (%) \pm desvio padrão	
	<i>G. vellosii</i>	<i>G. sericeum</i>
1,70 mm	0,12 \pm 0,00	66,18 \pm 2,87
710 μ m	22,55 \pm 0,39	17,73 \pm 0,64
355 μ m	43,66 \pm 0,61	9,45 \pm 0,27
250 μ m	10,17 \pm 0,05	3,53 \pm 0,03
180 μ m	8,74 \pm 0,54	2,79 \pm 0,19
125 μ m	7,07 \pm 0,85	0,20 \pm 0,02
Fundo coletor	7,69 \pm 0,57	0,13 \pm 0,03



Figura 9 - Aspecto físico do pó obtido das cascas de *G. vellosii* (A) e *G. sericeum* (B).

As densidades dos pós das cascas de *G. vellosii* (0,28 g/mL \pm 0,01) e de *G. sericeum* (0,38 g/mL \pm 0,01) foram baixas (Tabela 7), isto é, inferiores à densidade da água (densidade = 1). Este parâmetro é importante por influenciar diretamente no preparo do extrato, pois o pó de baixa densidade necessita de uma maior

quantidade de solvente durante o processo de extração para evitar a flutuação das partículas (AMARANTE, 2010).

Em relação à perda por dessecação, os pós de *G. vellosii* (10,36%) e *G. sericeum* (11,24%; Tabela 7) apresentaram valores dentro da faixa recomendada pela Farmacopeia Brasileira (8 a 14% de umidade; BRASIL, 2010b). Esta análise pode fornecer informações importantes com relação ao armazenamento do material vegetal, pois fornece, em valor mensurável, a umidade residual dos pós. Esse parâmetro, por sua vez, determina a estabilidade microbiológica da droga, como expressão de sua susceptibilidade ao desenvolvimento de microrganismos (bactérias e fungos) e estabilidade química, representada especialmente pelos processos de hidrólise (WHO, 1992).

Acredita-se também que excessiva quantidade de água em drogas vegetais propicia o desenvolvimento de micro-organismos, com consequente deterioração dos constituintes da droga, ocasionando a formação de artefatos. Sob o ponto de vista tecnológico e de produção, o conhecimento a respeito do conteúdo de água presente na matéria-prima é necessário para cálculos de rendimento (DE PAULA e PETROVICK, 1997).

Para realização de estudos fitoquímicos, é recomendado que o pó contenha até 10 % de água residual (SOUZA et al. 2003). Percentuais de água residual acima do limite estabelecido pela Farmacopeia Brasileira podem acarretar perda do material por contaminação microbiana, ou degradação por ação enzimática dos constituintes químicos (HUBINGER; SALGADO; MOREIRA, 2009). No presente estudo, os teores de perda por dessecação (umidade residual) foram bem próximo a 10%, sugerindo que a matéria-prima tenha qualidade adequada para realização dos estudos fitoquímicos (Tabela 7).

A média de três determinações para o pH do pó das cascas de *G. vellosii* foi de $4,94 \pm 0,09$, e de $6,47 \pm 0,25$ para *G. sericeum* (Tabela 7). Esses dados são fundamentais no processo de extração, pois o valor de pH é responsável por selecionar e determinar as substâncias a serem extraídas, de acordo com suas características químicas e de polaridade (LONGHINI et al. 2007). Uma parte destes ácidos encontra-se também no estado livre, solubilizados no citoplasma, portanto, podem ser identificados e caracterizar determinado extrato vegetal, como de caráter ácido e básico, auxiliando nos parâmetros físico-químicos da droga vegetal (FRANCO e LANDGRAF, 1996).

No entanto, essas espécies pertencem ao gênero cuja principal característica química é a presença de alcaloides indólicos (RAPOPORT et al. 1958; STEELE et al. 2002) e β -carbolínicos (HUGHES e RAPOPORT, 1958; STEELE et al. 2002), os quais são substâncias nitrogenadas, com um ou mais átomos de nitrogênio dispostos como amins primárias, secundárias ou terciárias, o que lhes confere um caráter básico (DOS SANTOS, 2015). Uma possível explicação para o pH ácido encontrado neste estudo é que a acidez do material vegetal pode evitar o ataque de alguns micro-organismos contaminantes, atuando como sensor da estabilidade ao sinalizar prováveis alterações químicas que possam estar ocorrendo no material vegetal quando esse estiver exposto ao meio extrativo (LONGHINI et al. 2007). Desta forma, a sinalização pode modificar o pH das células vegetais, promovendo desvio da rota da biossíntese de alguns metabólitos secundários (STRAYER, 1996) o que justifica a diminuição do pH encontrado nestes testes.

Observa-se que na Tabela 7, os valores obtidos de cinzas totais para *G. vellosii* (2,89 % \pm 0,05) e *G. sericeum* (2,29 % \pm 0,11) são inferiores ao limite preconizado na Farmacopeia Brasileira (12%; BRASIL, 2010b). A determinação do teor de cinzas totais de um vegetal constitui um ensaio de pureza para verificar a presença de compostos inorgânicos não-voláteis, presentes como contaminantes (SIMÕES et al. 2000). Esses materiais podem ser componentes minerais da própria planta (cinzas fisiológicas) e derivadas de materiais estranhos, especialmente areia e terra aderente à superfície da droga (cinzas não fisiológicas; BRASIL, 1998). Desta maneira, altos teores de cinzas podem indicar a presença de cinzas não fisiológicas, proveniente de tratamento inadequado na colheita, higienização e processamento do material vegetal (NAVARRO, 2009). Os baixos teores de cinzas totais, de ambas as espécies, sugerem que todas estas etapas (colheita, higienização e processamento da matéria-prima) foram adequadas.

Os valores do índice de espuma encontrado para *G. vellosii* (0,37 cm \pm 0,19) e *G. sericeum* (0,23 cm \pm 0,06) apresentaram altura da espuma inferior a 1 cm (índice de espuma menor que 100; BRASIL, 2010b), com isso, sugere-se que este material não contenha saponinas (Tabela 7). Estes metabólitos apresentam caráter anfifílico, com suas ações detergentes e emulsificante (SCHENKEL; GOSMANN; ATHAYDE, 2001), podendo desorganizar a membrana dos glóbulos vermelhos do sangue, resultando em hemólise (SUN; XIE; YE, 2009).

Outro estudo detectou presença de saponina (por testes químicos de identificação de grupos de substâncias) no extrato etanólico das cascas de *G. sericeum* (SAITO et al. 2006). Esta divergência pode estar relacionada a diferenças de sensibilidade entre as técnicas e nos aspectos ambientais que influenciam no metabolismo vegetal, proporcionando uma variação sazonal qualitativa dos constituintes químicos, entre eles a saponina (SOUZA et al. 2003). Não foi encontrado na literatura relato de saponinas isoladas em espécies de *Geissospermum*.

Tabela 7 - Análise farmacognóstica do pó das cascas de *G. vellosii* e *G. sericeum*.

Parâmetro	Média (%) ± Desvio Padrão	
	<i>G. vellosii</i>	<i>G. sericeum</i>
Densidade do pó	0,28 g/mL ± 0,01	0,38 g/mL ± 0,01
Perda por dessecação (Teor de água)	10,36 % ± 0,21	11,24 % ± 0,60
Teor de cinzas totais	2,89 % ± 0,05	2,29 % ± 0,11
pH	4,94 ± 0,09	6,47 ± 0,25
Índice de espuma	0,37 cm ± 0,19	0,23 cm ± 0,06

5.2. Fitoquímico

Os extratos etanólicos de *G. vellosii* (2,03%) e *G. sericeum* (2,20%; Tabela 8), obtidos através da maceração dos pós das cascas com etanol, apresentaram baixo rendimento na extração, mesmo com partículas de tamanho superior à classificação de fino (Tabela 6). Isso deve-se ao fato de que a trituração do material vegetal não gerou nas granulometrias pós homogêneos que permitissem, de forma facilitada e consistente, a penetração de solventes no material (MELLO e PETROVICK, 2000). A polaridade do solvente pode ter sido outro fator influenciador na extração, pois solventes alcoólicos proporcionam a extração de um amplo espectro de substâncias polares e apolares, resultando em frações de distintas polaridades (BONOMINI, 2013).

Os extratos foram submetidos à prospecção fitoquímica utilizando o método de cromatografia em camada delgada para monitorar a presença de alcaloides (WAGNER; BLADT; ZGAINSKI, 1984). O extrato etanólico de *G. vellosii* e *G.*

sericeum apresentaram bandas sugestivas de alcaloides quando reveladas em fluorescência (365 nm) e reagente de Dragendorff (Figura 10). Os primeiros estudos fitoquímicos realizados em *G. vellosii* levaram ao isolamento dos alcaloides: flavopereirina (Quadro 1:18; RAPOPORT et al. 1958; HUGUES e RAPOPORT, 1958), geissospermina (Quadro 1:24), geissoschizolina (Quadro 1:5; RAPOPORT et al. 1958), vellosimina (Quadro 1:28), velosiminol (Quadro 1:27) e a geissolosimina (Quadro 1:25; RAPOPORT e MOORE, 1962; MOORE e RAPOPORT, 1973).

Em síntese aos estudo já apresentados, a *G. vellosii* possui alcaloides β -carbolínico: flavopereirina (Quadro 1:18; HUGHES e RAPOPORT, 1958); alcaloides indólicos monoterpnoídicos: geissovellina (Quadro 1:29; MOORE e RAPOPORT, 1973), geissoschizolina (Quadro 1:5; BERTHO; KOLL; FEROSIE, 1958; BERTHO e KOLL, 1961) geissoschizona (Quadro 1:26; MBEUNKUI et al. 2012; RAPOPORT e MOORE, 1962), vellosimina (Quadro 1:28; RAPOPORT e MOORE, 1962), vellosiminol (Quadro 1:27; MBEUNKUI et al. 2012; RAPOPORT e MOORE, 1962), aspidospermina (Quadro 1:34; DIAS, 2012), 12-metoxi-1-metil-aspidospermidina (Quadro 1:30; WERNER et al. 2009), pausperadina A (Quadro 1:31; ISHIYAMA et al. 2005), desmetoxiaspidospermina (Quadro 1:7), aspidoscarpina (Quadro 1:7), demetillaspidospermina (Quadro 1:7; PACCIONI e HUSSON, 1978) e bisindólicos: geissospermina (Quadro 1:24; MARION, 1952) e geissolosimina (Quadro 1:25; RAPOPORT e MOORE, 1962).

No entanto, da *G. sericeum* somente foram isolados o alcaloide indólico geissoschizolina (Quadro 1:5; MANSKE e HARRISON, 1965; STEELE et al. 2002), geissoschizolina N⁴-óxido (Quadro 1:20) e 1,2-deidrogeissoschizolina (Quadro 1:21), e o alcaloide β -carbolínico flavopereirina (Quadro 1:18; STEELE et al. 2002).

Os extratos foram submetidos ao fracionamento por extração sob refluxo resultando em 4 frações, das quais, as frações metanólica de *G. vellosii* (97%) e *G. seiceum* (70,6%; Tabela 8) apresentaram maiores rendimentos, indicando que o extrato é rico em substâncias polares.

Outro método utilizado para o fracionamento dos extratos foi a partição ácido-base sendo obtidas 2 frações: fração de neutros (*G. vellosii* = 42,8% e *G. sericeum*= 17,3%) e fração alcaloídica (*G. vellosii* = 27,5% e *G. sericeum*= 10,7%; Tabela 8). Observa-se que, as frações em que os alcaloides provalmente estão presentes possuem menores rendimentos.

De forma semelhante ao extrato, estas frações foram analisadas em CCD, sendo detectada, possivelmente, a presença de alcaloides em ambas as frações (UV= positivo e Dragendorff= positivo; Figura 10), o mesmo ocorreu com as frações de neutros e alcaloídica obtidos de *G. sericeum* (Tabela 8).

Tabela 8 - Rendimento e cromatografia em camada delgada de *G. vellosii* e *G. sericeum*.

Amostra	Rendimento		CCD		Observação
	<i>G. vellosii</i>	<i>G. sericeum</i>	U.V	Dragendorff	
EE	10,13 g (2,0%)	10,99 g (2,2%)	+	+	
FN	2,14 g (42,8%)	0,87 g (17,3%)	+	+	
FA	1,37 g (27,5%)	0,54 g (10,7%)	+	+	
FrHex	0,09 g (1,8%)	0,21 g (4,2%)	+	+	Sugestivo de alcaloide
FrDcm	0,29 g (5,8%)	0,32 g (6,4%)	+	+	
FrAcOET	0,11 g (2,2%)	0,09 g (1,8%)	+	+	
FrMeOH	4,26 g (85,2%)	3,83 g (76,6%)	+	+	

Legenda: CCD: Cromatografia em Camada Delgada; U.V.: ultravioleta; EE: Extrato Etanólico; FN: Fração de Neutro; FA: Fração Alcaloídica; FrHex: Fração Hexânica; FrDcm: Fração diclorometano; FrAcOET: Fração Aceto de Etila; FrMeOH: Fração Metanólica.

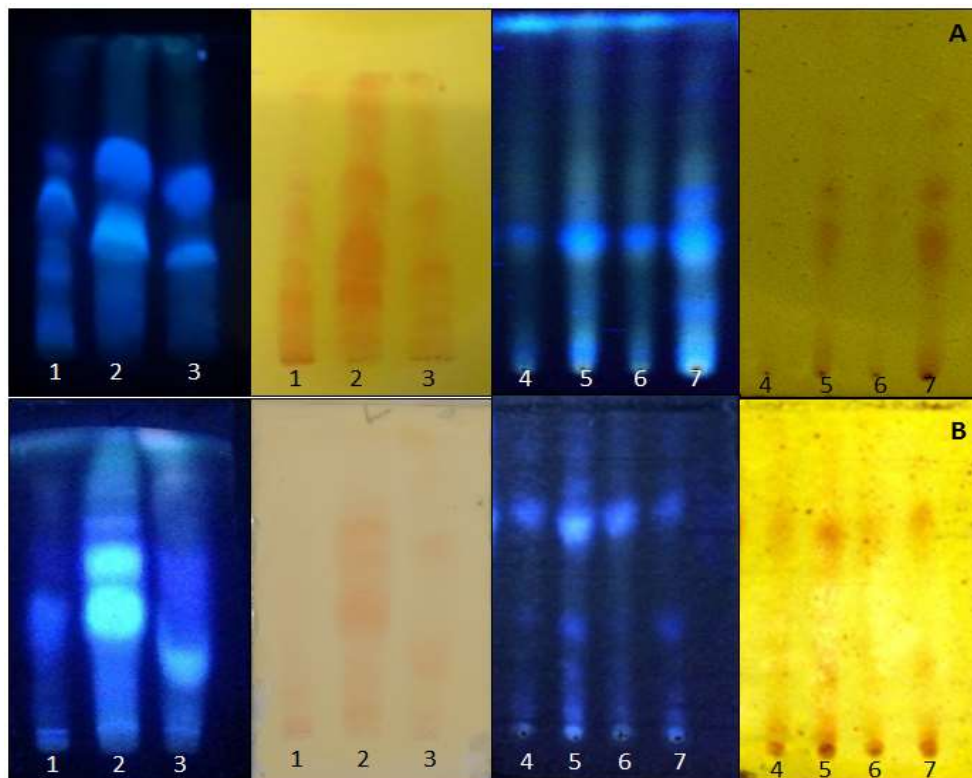


Figura 10 - Análise cromatográfica em camada delgada do extrato etanólico e frações de *G. vellosii* e *G. sericeum*, reveladas em UV (365nm) e reagente dragendorff.

Legenda: A: *G. vellosii*; B: *G. sericeum*; 1. Extrato etanólico; 2. Fração alcaloídica; 3. Fração de neutro; 4. Fração Hexano; 5. Fração Diclorometano; 6. Fração Acetato de etila; 7. Fração Metanólica.

Baseado nos estudos cromatográficos (CCD) selecionou-se as frações alcaloídicas de *G. vellosii* (FAGV- 1,6858g) e *G. sericeum* (FAGS- 1,4015g) para o fracionamento. Para isso, as frações foram solubilizadas em metanol, filtrada em Solid Phase Extraction (SPE, C18) e fracionadas em colunas cromatográficas abertas utilizando o gel lipofílico Sephadex LH-20 (fase estacionária) e metanol (fase móvel). Este fracionamento permitiu a realização de 24 coletas de *G. vellosii* (Tabela 9) e 18 coletas de *G. sericeum* (Tabela 10). Todas as subfrações foram submetidas a análises em CCD, reveladas com UV (365nm) e reagente de Dragendorff.

As subfrações 5 a 8 de *G. vellosii* apresentaram perfil cromatográfico sugestivo de alcaloides. As subfrações 11-13 e 15-18 não apresentaram fluorescência azul, porém revelaram bandas alaranjadas em reagente de dragendorff, sugerindo resultado falso positivo para alcaloides (Tabela 9). Baseado no perfil cromatográfico e no rendimento, selecionou-se a subfração 6 (F6FAGV) para análise em CLAE-DAD (Figura 12), após análise, seguiu-se para novo fracionamento cromatográfico.

As subfrações 6 a 18 de *G. serieum* apresentaram perfil cromatográfico sugestivo de alcaloides (Tabela 10). Semelhante a *G. vellosii*, a subfração de *G. sericeum* (F6FAGS) foi selecionada para novo fracionamento. Acredita-se que as subfrações analisadas (F6FAGV e F6FAGS) tenham os alcaloides como compostos majoritários (Tabela 9 e 10; Figura 11), devido a existência de relatos do isolamento de alcaloides destas (RAPOPORT e MOORE, 1962; MOORE e RAPOPORT, 1973; STEEL et al. 2002; ISHIYAMA et al. 2005; WERNER et al. 2009; DIAS, 2012) e de outras espécies pertencentes a este gênero (CAMARGO et al. 2013).

Tabela 9 - Rendimentos e análise cromatográfica das subfrações obtidas da fração alcaloídica de *G. vellosii* por coluna de Sephadex.

Subfração	Rendimento	CCD	
		UV	Dradendorff
F1FAGV	7,0 mg (0,42%)	-	-
F2FAGV	9,6 mg (0,57%)	-	-
F3FAGV	36,1 mg (2,14%)	-	-
F4FAGV	80,3 mg (4,76%)	-	-
F5FAGV	547,3 mg (32,47%)	+	+
F6FAGV	455,9 mg (27,0%)	+	+
F7FAGV	46,3 mg (2,75%)	+	+
F8FAGV	17,4 mg (1,0%)	+	+
F9FAGV	72,2 mg (4,28%)	+	-
F10FAGV	28,3 mg (1,68%)	-	+
F11FAGV	31,3 mg (1,86%)	-	+
F12FAGV	23,2 mg (1,38%)	-	+
F13FAGV	16,8 mg (1,00%)	-	-
F14FAGV	20,3 mg (1,20%)	-	+
F15FAGV	27,2 mg (1,61%)	-	+
F16FAGV	23,8 mg (1,41%)	-	+
F17FAGV	19,4 mg (1,15%)	-	+
F18FAGV	20,4 mg (1,21%)	-	+
F19FAGV	12,9 mg (0,77%)	-	-
F20FAGV	47,2 mg (2,80%)	-	+
F21FAGV	17,0 mg (1,01%)	-	+
F22FAGV	14,4 mg (0,85%)	-	+
F23FAGV	12,9 mg (0,77%)	-	+
F24FAGV	11,4 mg (0,68%)	-	+

Legenda: GV: *Geissospermum vellosii*; CCD: Cromatografia em Camada Delgada; UV: Ultravioleta; F1FAGV: Subfração da Fração Alcaloídica de *Geissospermum vellosii*.

Tabela 10 - Rendimentos e análise cromatográfica das subfrações obtidas da fração alcaloídica de *G. sericeum* por coluna de Sephadex.

Subfração	Rendimento	CCD	
		UV	Dradendorff
F1FAGS	0,0 mg (0,0%)	-	-
F2FAGS	81,6 mg (5,8%)	-	-
F3FAGS	70,1 mg (5,0%)	-	-
F4FAGS	112,5 mg (8,0%)	-	-
F5FAGS	61,7 mg (4,4%)	-	-
F6FAGS	489,7 mg (34,9%)	+	+
F7FAGS	153,7 mg (11,0 %)	+	+
F8FAGS	23,9 mg (1,7%)	+	+
F9FAGS	7,8 mg (0,6%)	+	+
F10FAGS	7,8 mg (0,6%)	+	+
F11FAGS	88,1 mg (6,3%)	+	+
F12FAGS	88,5 mg (6,3%)	+	+
F13FAGS	86,0 mg (6,1%)	+	+
F14FAGS	7,3 mg (0,5%)	+	+
F15FAGS	84,3 mg (6,0%)	+	+
F16FAGS	4,6 mg (0,3%)	+	+
F17FAGS	2,3 mg (0,2%)	+	+
F18FAGS	8,9 mg (0,6%)	+	+

Legenda: GS: *Geissospermum sericeum*; CCD: Cromatografia em Camada Delgada; UV: Ultravioleta; F1FAGV: da Fração Alcaloídica de *Geissospermum vellosii*.

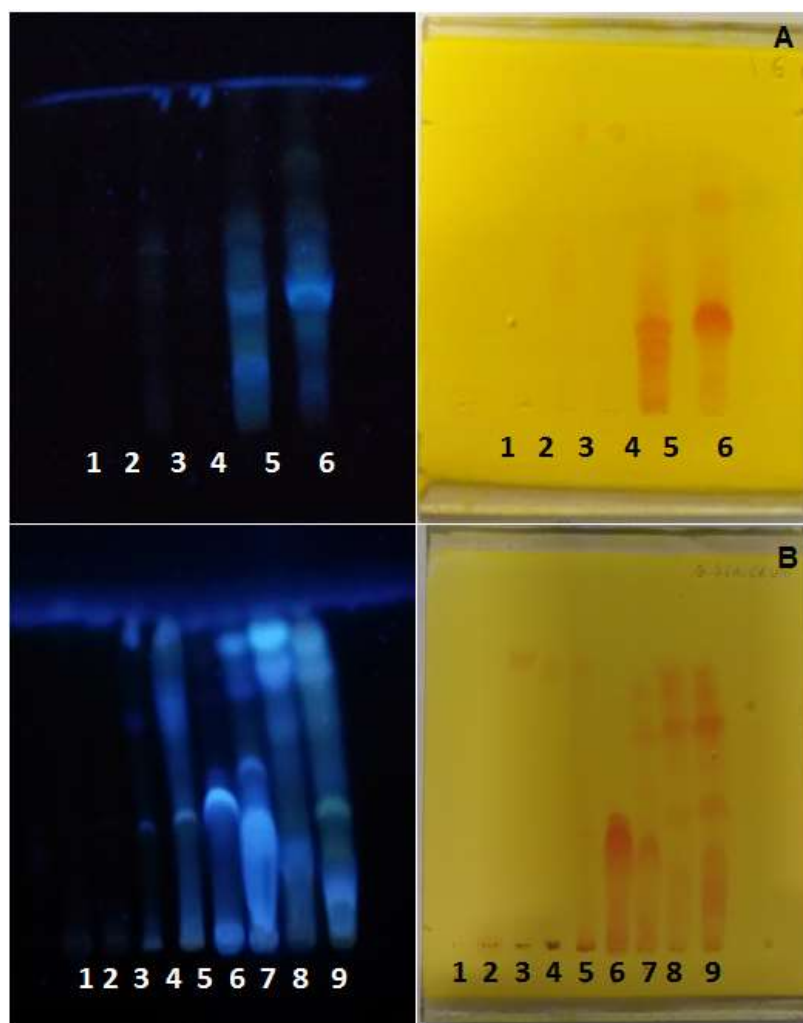


Figura 11 - Análise cromatográfica em camada delgada das subfrações de *G. vellosii* e *G. sericeum*, reveladas em UV (365nm) e reagente dragendorff.

Legenda: A: *G. vellosii*; B: *G. sericeum*; 1-6. Subfração F1FAF6GV à subfração F6FAF6GV; 1-9. Subfração F1FAF6GS à subfração F9FAF6GS.

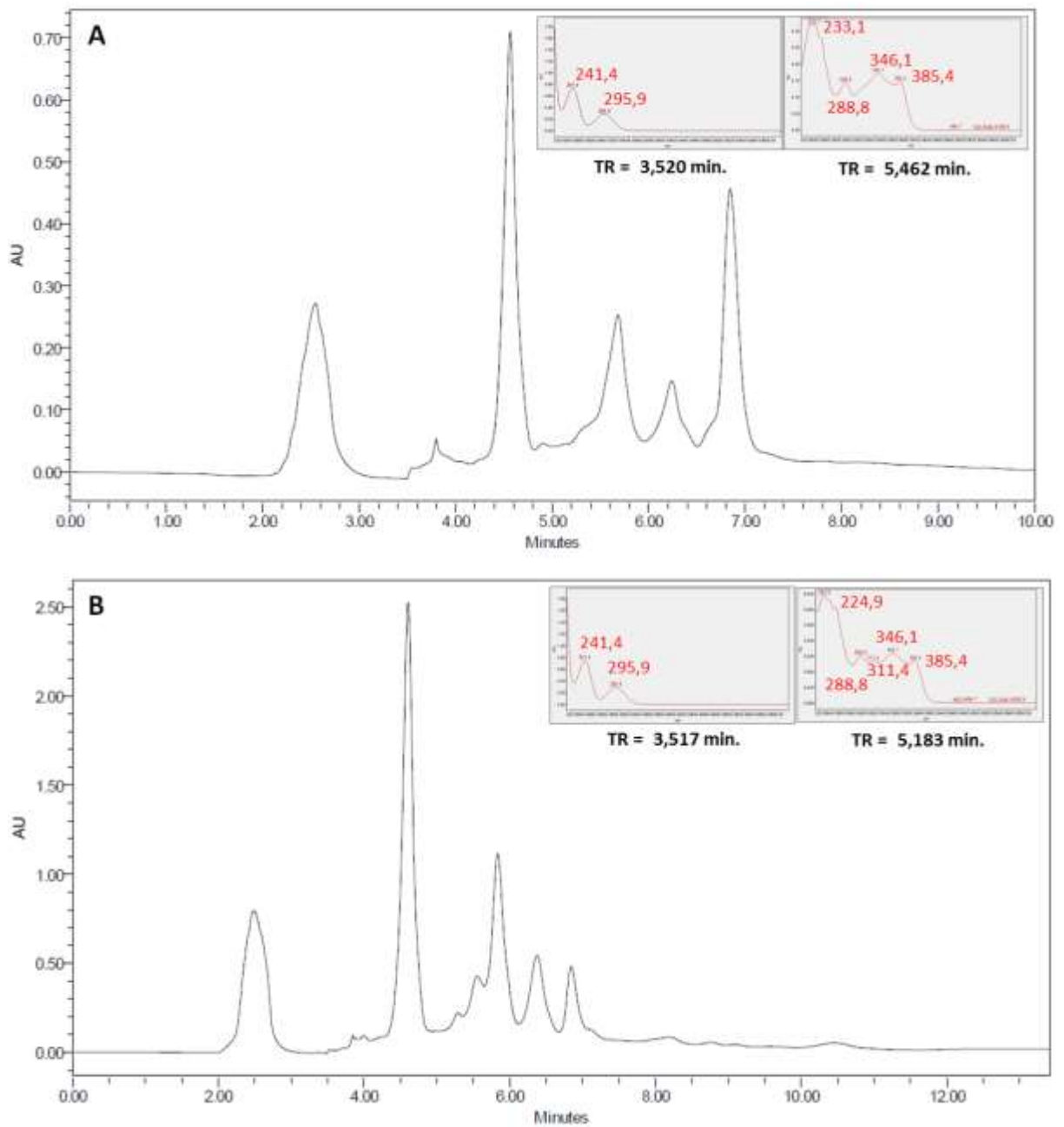


Figura 12 - Análise em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao Detector de Arranjos de Diodos (CLAE-DAD) das subfrações de *G. vellosii* e *G. sericeum*.

Condições de eluição: tempo de varredura de 15 min. em gradiente linear de 80 a 20 %, empregando-se água deionizada (MilliQ) (eluente A) e acetonitrila (eluente B), fluxo de 1 mL/min., injetando-se 20 μ L e detecção em UV 200 a 600 nm.

Legenda: A- subfração F6FAGV; B- subfração F6FAGS.

As subfrações (F6FAGV e F6FAGS) submetidas em CLAE-DAD semipreparativa, proporcionaram quatro coletas da fração F6FAGV e sete da fração F6FAGS (Tabela 11). Ao final deste fracionamento esperava-se que os alcaloides estivessem sido isolados.

Tabela 11 - Rendimento das subfrações obtidas por CLAE-DAD semipreparativa.

Subfração	Rendimento <i>G. vellosii</i>	Subfração	Rendimento <i>G. sericeum</i>
F1F6FAGV	29,2 mg (24,2%)	F1F6FAGS	18,3 mg (12,2%)
F2F6FAGV	38,1 mg (31,6%)	F2F6FAGS	10,7 mg (7,1%)
F3F6FAGV	20,3 mg (16,8%)	F3F6FAGS	31,3 mg (20,9)
F4F6FAGV	7,2 mg (0,1%)	F4F6FAGS	1,7 mg (1,1%)
-	-	F5F6FAGS	11,6 mg (7,7%)
-	-	F6F6FAGS	6,3 mg (4,2%)
-	-	F7F6FAGS	3,4 mg (2,3%)

Legenda: GV: *Geissospermum vellosii*; GS: *Geissospermum sericeum*; F1F6FAGV ou F1F6FAGS – subfração da F6FA das espécies correspondentes.

No entanto, observou-se que somente as subfrações F3F6FAGV, F3F6FAGS, F4F6FAGV e F7F6FAGV apresentaram melhor grau de pureza observado em CLAE-DAD (Figura 13). As frações F3F6FAGV e F3F6FAGS apresentaram picos majoritários com TR= 3,522 min. e 3,525 min. com semelhantes espectros em ultravioleta (λ de 240,2 e 294,7 nm. e λ de 240,2 e 295,9 nm; Figura 13). Estas subfrações foram submetidas as análises em Ressonância Magnética Nuclear.

As subfrações F4F6FAGV (TR= 5,414 min.) e F7F6FAGV (TR= 5,551 min.) apresentaram tempos de retenção semelhantes e mesmo espectro no UV (λ de 234,3, 288,8, 346,1, 385,4 nm; Figura 13), sugerindo tratar-se da mesma substância. Com isso, ressalta-se a hipótese de que o processo de fracionamento contribui para o isolamento de um alcaloide indólico, provavelmente, a geissoschizolina (RAPOPORT et al. 1958; STEELE et al. 2002) e um alcaloide β -carbolínico, provavelmente, a flavopereirina (HUGHES e RAPOPORT, 1958; STEELE et al. 2002). Visando confirmar esta hipótese, todas as subfrações foram submetidas à RMN.

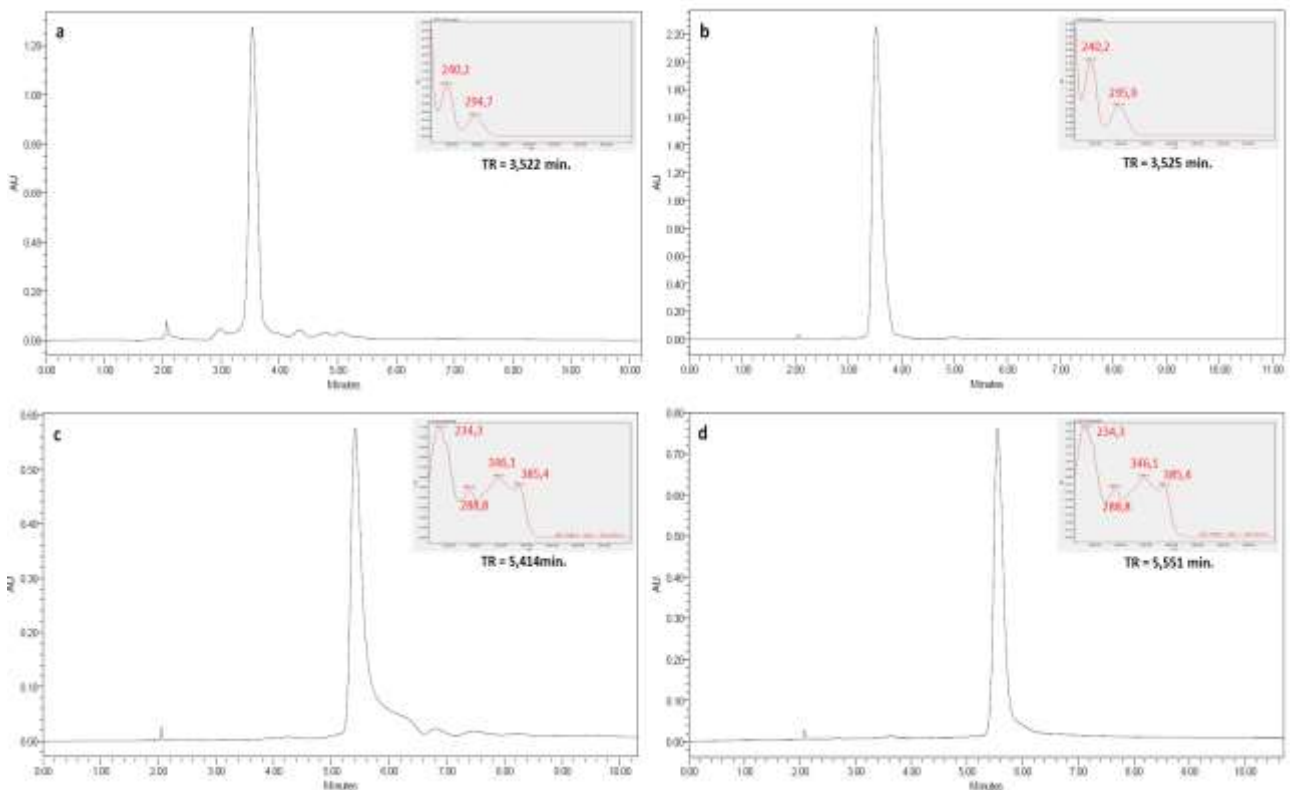


Figura 13 - Análise em Cromatográfica Líquida de Alta Eficiência semipreparativa (CLAE-DAD semiprep.) das subfrações de *G. vellosii* e *G. sericeum*.

Condições de eluição: tempo de varredura de 10 min. em gradiente linear de 80 a 20 %, empregando-se água deionizada (MilliQ) (eluente A) e acetonitrila (eluente B), fluxo de 10 mL/min., injetando-se 500 μ L e detecção em UV 200 a 600 nm.

Legenda: a: F3F6FAGV; b: F3F6FAGS; c: F4F6FAGV; d- F7F6FAGS.

Nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C para as substâncias F3F6FAGV, F3F6FAGS, F4F6FAGV e F7F6FAGS, as atribuições dos sinais obtidos foram baseadas na comparação com os dados relatados na literatura para alcaloides indólicos e alcaloides β -carbolínicos (Figura 14-17; Tabela 12).

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C obtidos para substância F3F6FAGV e F3F6FAGS (Figura 14-17; Tabela 12), apresentaram sinais que permitiram confirmar seu caráter alcaloídico. A atribuição dos sinais baseou-se na comparação com dados de alcaloides indólicos (STEELE et al. 2002). Assim, os espectros mostraram presença de três átomos de carbono quaternários, nove de carbono metino e seis de carbonos metilênico. Ocorreu a ressonância característica de um álcool (CH_2OH ; H-17 δ_{H} 3,64 (dd, $J= 10,5$ e $6,6$) e 3,76 (dd), para *G. vellosii*; H-17 δ_{H} 3,41 (dd, $J= 10,5$ e $6,6$) e 3,74 (t, $J= 3,3$), para *G. sericeum*). Essas espécies apresentaram os mesmos sinais em δ_{C} 65,5 (C-17), de um grupo metila (CH_3 ; H-18, δ_{H} 1,01 (t, $J=7,2$);

H-19, δ_H 1,29 (m) e 1,36 (m), para *G. vellosii*; H-18, δ_H 1,01 (t, J= 7.5); H-19, δ_H 1,23 (m) e 1,25 (m), para *G. sericeum*); sinais em δ_c 11.5 (C-18) e δ_c 23.3 (C-19), para ambas as espécies; e sinais típicos do grupo indol em (H-9, δ_H 7.32 (d, J= 7.2); H-10, δ_H 6.79 (t, J= 0.9); H-11, δ_H 6.79 (td, J= 0.9, 0.6); H-12, δ_H 6.65 (d, J= 7.8), para *G. vellosii*; e H-9, δ_H 7.31 (d, J= 6.9); H-10, δ_H 6.80 (t, J= 1.2); H-11, δ_H 6.79 (td, J= 1.2, 0.9); H-12, δ_H 6.64 (d, J= 0.6), para *G. sericeum*). O espectro de RMN ^{13}C confirmou a existência do grupo indol através dos sinais dos carbonos sp^2 (C-9, C-10, C-11 e C-12) para ambas as espécies (Figura 18; Tabela 12).

Além disso, houve similaridade entre os sinais de 1H e ^{13}C desses compostos com o alcaloide Geissoschizolina N⁴-óxido (STEELE et al. 2002), porém com diferença nos sinais referente aos carbonos C-3 (- 3,9), C-5 (- 3,5), C-7 (- 0,6), o que pode corresponder a uma alteração na posição do N-óxido (Figura 18; Tabela 12). Por isso, acredita-se que a substância em questão ainda não foi descrita na literatura pois nenhum perfil químico com essas alterações foi encontrado. Com isso, há necessidade de se realizar outros estudos espectrométricos (RMN 2D e massa de alta resolução) a fim de se elucidar a estrutura química desse composto.

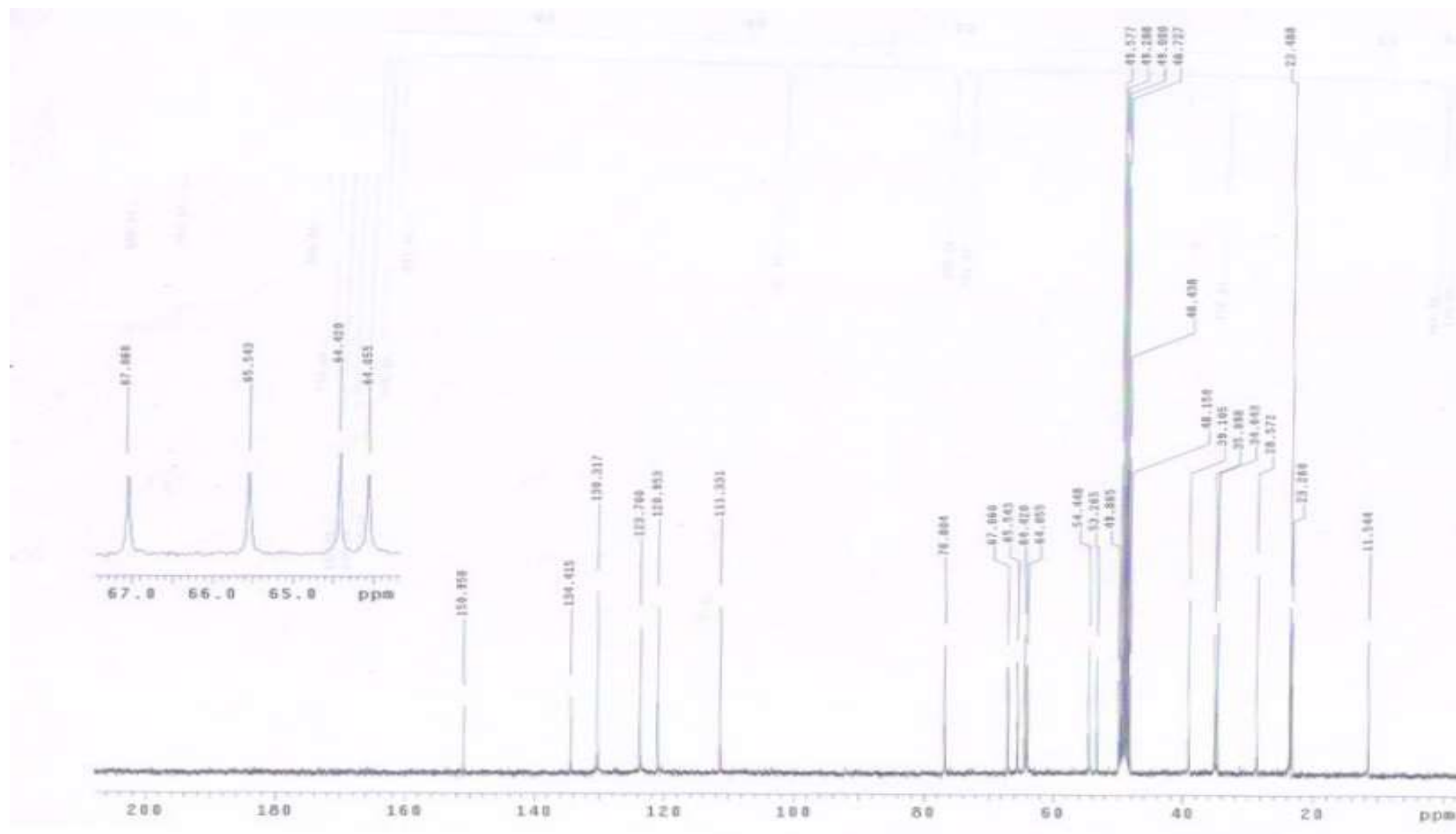


Figura 14 - Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C da substância F3F6FAGV obtida a partir da Subfração F6FAGV das cascas de *G. vellosii* – 300 MHz, CD_3OD .

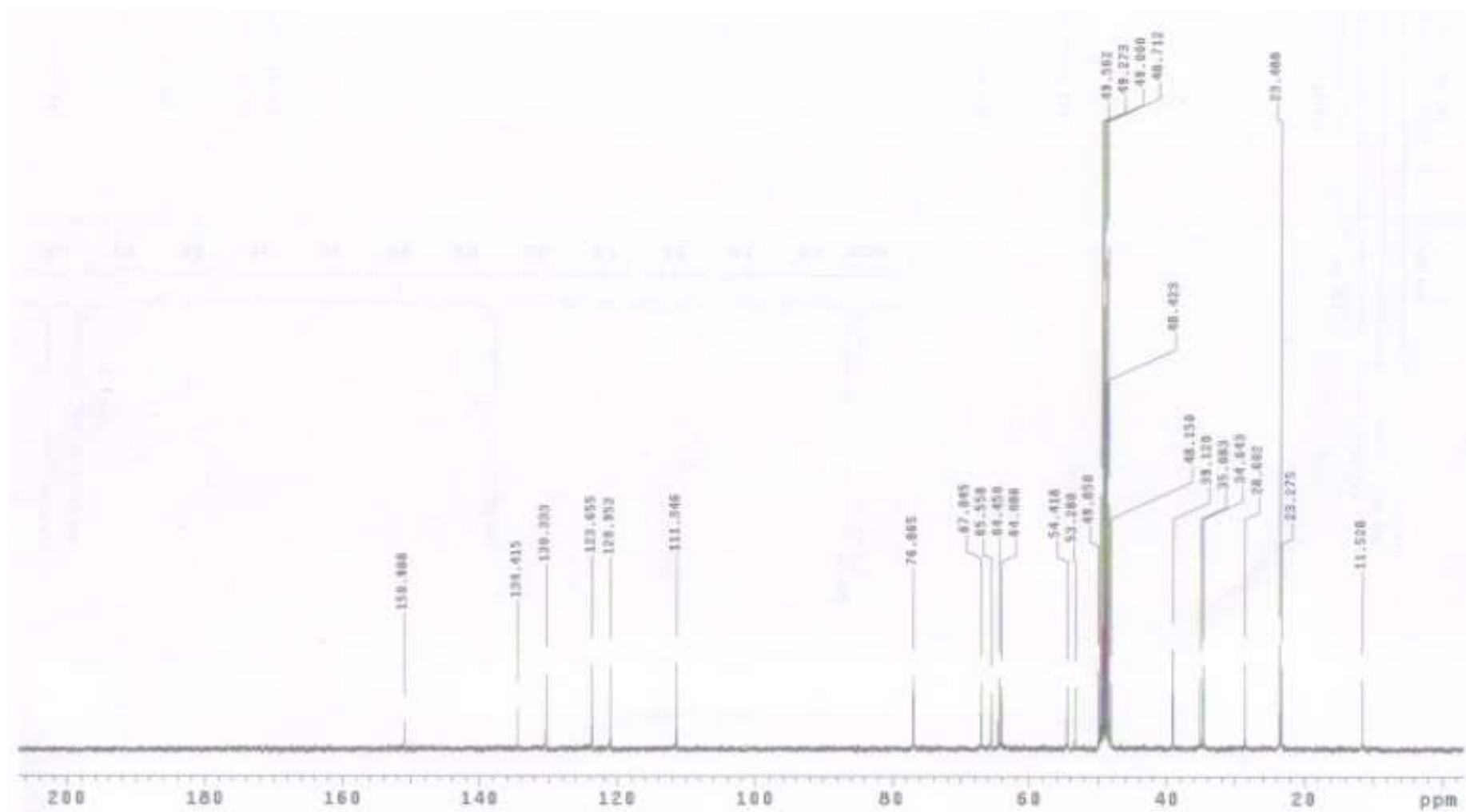


Figura 15: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C da substância F3F6FAGS obtida a partir da Subfração F6FAGS das cascas de *G. sericeum*–300 MHz, CD_3OD .

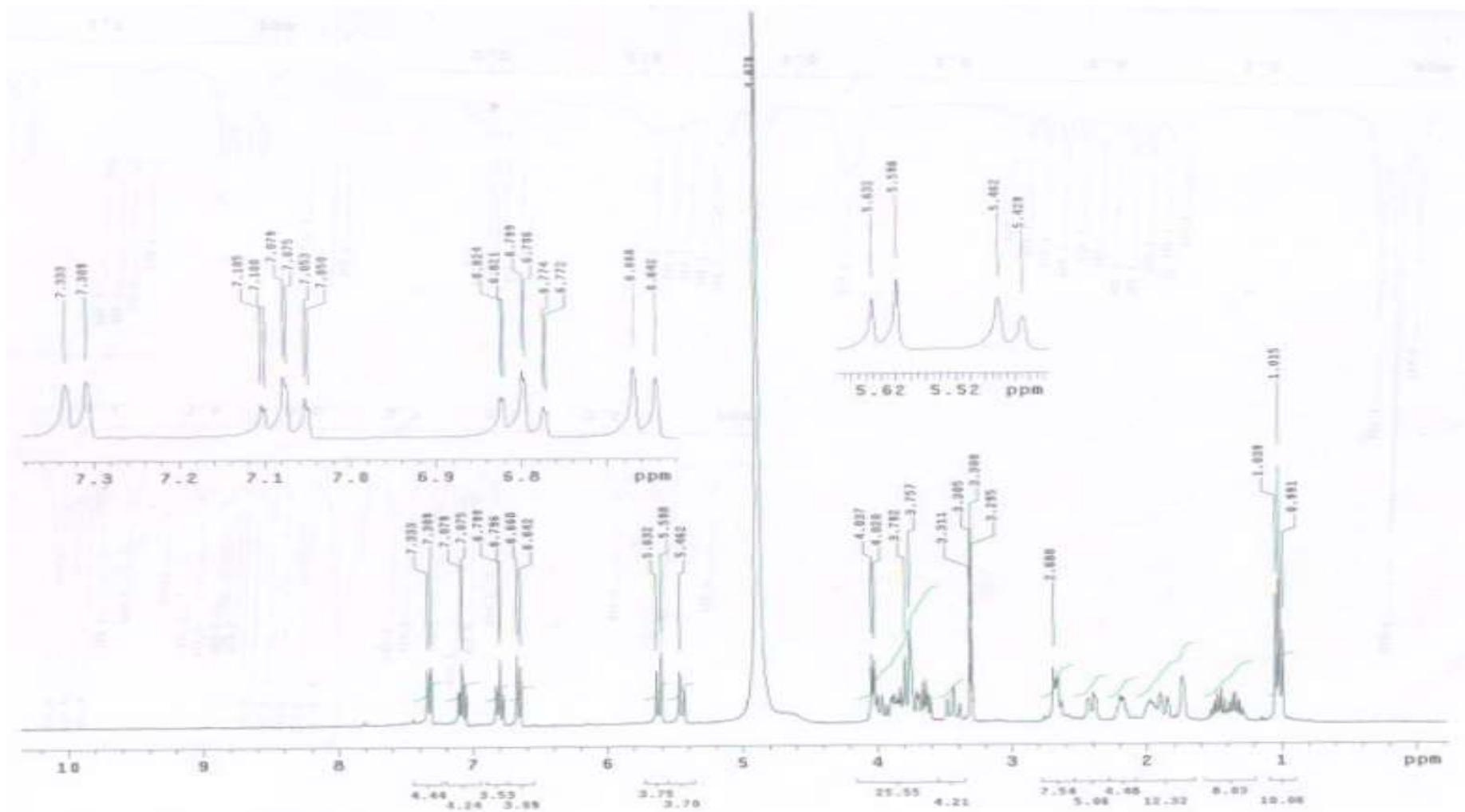


Figura 16: Espectro de ressonância magnética nuclear de ^1H da substância F3F6FAGV obtida a partir da Subfração F6FAGV das cascas de *G. vellosii* – 300 MHz, CD_3OD .

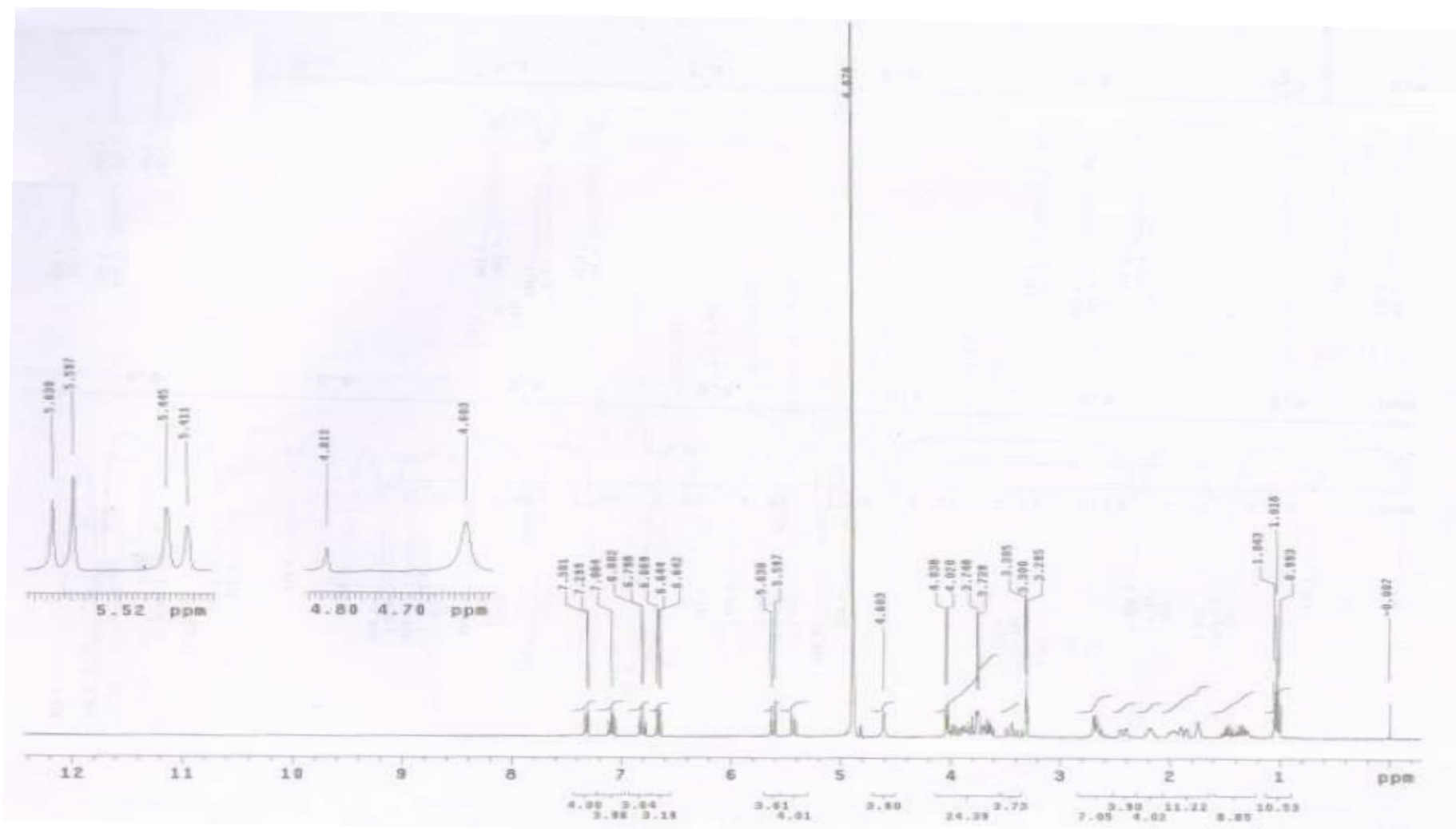


Figura 17: Espectro de ressonância magnética nuclear de ^1H da substância F3F6FAGS obtida a partir da Subfração F6FAGS das cascas de *G. vellosii* – 300 MHz, CD_3OD .

Tabela 12: Dados das atribuições dos sinais de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C da substância F3F6FAGV de *G. vellosii*.

Posição	Substância F3F6FAGV		Substância F3F6FAGS		Geissoschizolina N ⁴ -óxido ^a	
	δ H (ppm) (m, J em Hz)	δ C (ppm) (multiplicidade)	δ H (ppm)	δ C (ppm)	δ H (ppm)	δ C (ppm)
1						
2	3.87 (d, 2.4)	64,1	3.86 (d, 1.5)	64,1	3.90 (d, 4.9)	63,6
3	3.38 (s)	76,8	3.38 (s)	76,8	3.39 (br s)	80,7
4						
5	3.63 (s)	67,1	3.64 (s)	67,1	3.64 (2H, m)	70,6
6	1.95 (m) 2.40 (dd, 14.4 e 5.1)	35,1	1.99 (m) 2.41 (dd, 15, 2.4)	35,1	2.05 (m) 2.49 (dd, 14.4, 7.3)	34,8
7		49,2		49,2		49,8
8		134,4		134,4		134,6
9	7.32 (d, 7.2)	123,7	7.31 (d, 6.9)	123,7	7.04 (d, 7.3)	122
10	6.79 (t, 0.9)	120,9	6.80 (t, 1.2)	120,9	6.69 (t, 7.3)	119,2
11	6.79 (td, 0.9, 0.6)	130,3	6.79 (td, 1.2, 0.9)	130,3	6.99 (td, 7.3, 0.8)	128,6
12	6.65 (d, 7.8)	111,3	6.64 (d, 0.6)	111,3	6.52 (d, 7.7)	109,7
13		150,9		150,9		149,8
14	2.18 (m) 1.86 (dt)	23,5	1.94 (m) 2.14 (d)	23,5	1.94 (m) 2.17 (br d, 11.6)	22,5
15	1.35 (s)	28,6	1.35 (s)	28,6	1.36 (br s)	27,2
16	1.98 (m)	34,6	1.92 (m)	34,6	1.93 (m)	33,7
17	3.64 (dd, 10.5 e 6.6) 3.76 (dd)	65,5	3.41 (dd, 10.5 e 6.6) 3.74 (t, 3.3)	65,5	3.47 (dd, 10.8, 5.3) 3.73 (t, 10.9)	64,6
18	1.01 (t, 7.2)	11,5	1.01 (t, 7.5)	11,5	0.84 (t, 7.3)	11,2
19	1.29 (m) 1.36 (m)	23,3	1.23 (m) 1.25 (m)	23,3	1.12 (m) 1.25 (m)	22,2
20	1.95 (m)	39,1	2.00 (m)	39,1	2.05 (m)	38,2
21		64,4	3.34 (m)	64,4	3.27 (2H, m)	63,5

Legenda: Substância F3F6FAGV e F3F6FAGS= dados obtidos no presente trabalho (300 MHz, CD₃OD). a = dados relatados por STEELE et al. (2002; 125 MHz, CDCl₃). d: duplete; dd: duplo duplete; m: multiplete; t: tripleto; dt: duplo tripleto; H: hidrogênio; J: constante de acoplamento escalar, unidade Hertz.

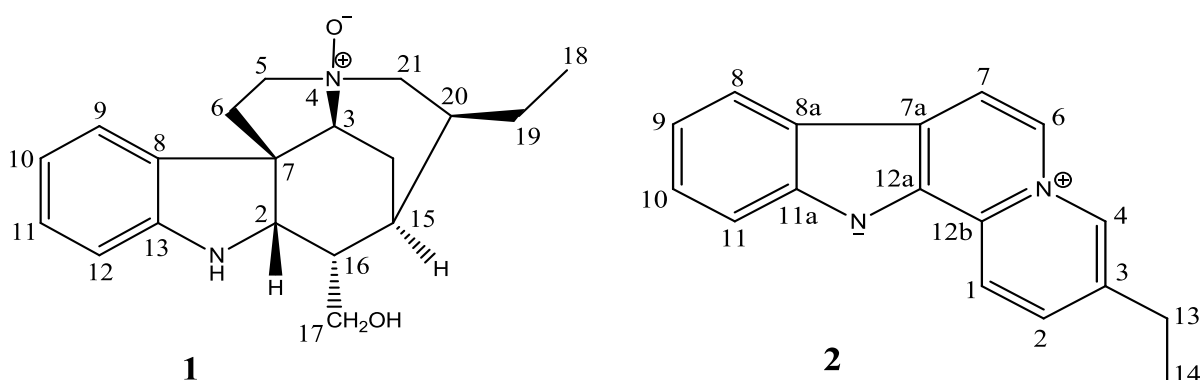


Figura 18 – Sugestão de estruturas químicas das substâncias F3F6FAGV e F3F6FAGS (estrutura 1) e F4F6FAGV e F7F6FAGS (estrutura 2).

O espectro de RMN do ^1H obtido para substância F4F6FAGV (Figura 19; Tabela 13) apresentou sinais que permitiram confirmar seu caráter β -carbolínico, já observado nos comprimentos de ondas (UV, MeOH) analisados nos cromatogramas (Figura 13). A atribuição dos sinais baseou-se na comparação com dados relatados para alcaloides β -carbolínico (STEELE et al. 2002).

O espectro de RMN de ^1H de F4F6FAGV consiste principalmente de ressonâncias de prótons aromático em conjunto com os de um grupo eteno ligado a um carbono quaternário (H-14, δ_c 1,45 - t, $J= 7.2$; e H-13, δ_H 2,99 - q, $J= 7.5$). As relações estruturais entre os prótons aromáticos e a localização do substituinte eteno apresentam similaridades com alcaloide β -carbolínico flavopereirina (STEELE et al. 2002).

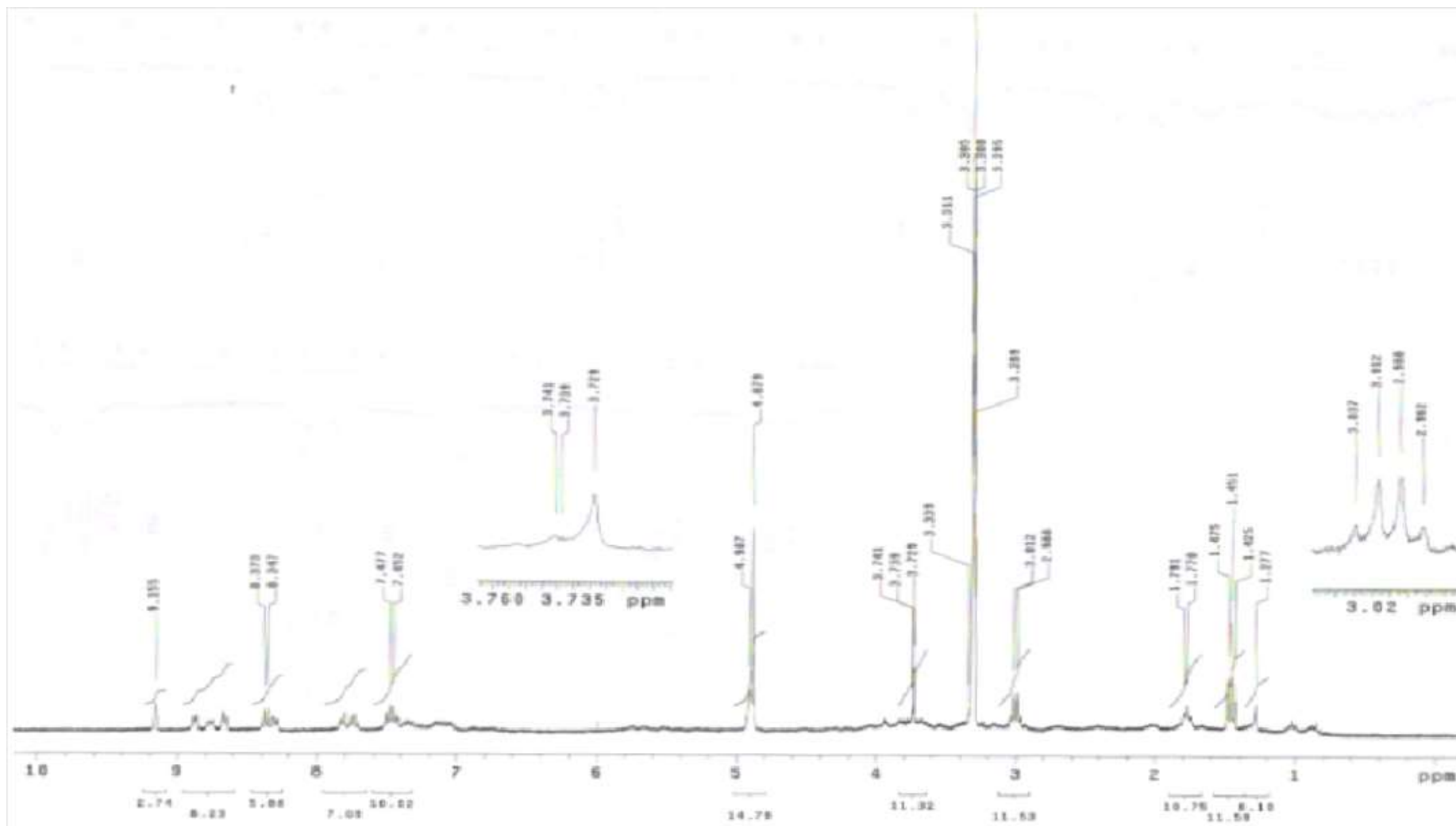


Figura 19 - Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H da substância F4F6FAGV obtida das cacas de *G. vellosoi* – 300 MHz, CD_3OD .

Tabela 13: Dados das atribuições dos sinais de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H da substância F4F6FA de *G. vellosii*.

Posição	Substância F4F6FAGV δ H (ppm) (m, J em Hz)	Flavopereirina ^a δ H (ppm)
1	8.76 (d, 9.0)	9.02 (d, 8.7)
2	8.30 (d, 8.1)	8.32 (d, 8.7)
3		
4	9.16 (s)	9.30 (s)
5		
6	8.87 (d, 6.3)	8.93 (d, 6.7)
7	8.66 (d, 6.9)	8.75 (d, 6.7)
8	8.36 (d, 7.8)	8.40 (d, 8.1)
9	7.48 (t, 7.8)	7.40 (t, 7.7)
10	7.74 (t, 6.9)	7.67 (td, 8.1, 1.0)
11	7.82 (d, 8.4)	7.86 (d, 8.1)
12		
13	2.99 (q, 7.5)	2.93 (q, 7.5)
14	1.45 (t, 7.2)	1.37 (t, 7.5)

Legenda: Substância F4F6FAGV= dados obtidos no presente trabalho (300 MHz, CD_3OD). a= dados relatados por STEELE et al. (2002; 500 MHz, DMSO). d: duplete; dd: duplo duplete; m: multiplete; q: >4; t: triplete; td: triplo duplete; J: constante de acoplamento escalar, unidade Hertz.

Na análise do espectro de massas para a substância F3F6FAGV e F3F6FAGS (Figura 20-22), foi observado os íons molecular $[M + H]^+$ m/z 315,37, reforçando a hipótese de ser a mesma substância. A fragmentação desse íon originou o íon de m/z 297,65 após perda de 18 unidades de massa referentes à uma molécula de água (H_2O), o íon de m/z 160,21 após perda de 155 unidades de massa referentes à uma molécula $C_9H_{17}NO$, e o íon de m/z 122,27 após perda de 193 unidades de massa referentes à uma molécula $C_{12}H_{19}NO$ (Figura 22).

A análise do espectro de RMN (1H , Figura 19; Tabela 13) e espectro de Massas (Figura 23-24) foi realizada somente para a substância F4F6FAGV devido a similaridade no perfil cromatográfico das espécies e o baixo rendimento das amostras (F4F6FAGV e F7F6FAGS). Observou-se presença do íon molecular $[M + H]^+$ m/z 247,58. A fragmentação desse íon originou o íon m/z 232,48 após perda de 15 unidades de massa referente à uma metila (CH_3), o íon m/z 128,14 após perda de 129,43 unidades de massa referente à uma unidade isoprênica (C_5H_7), o íon m/z 176,61 após perda de 71 unidades de massa referente ao núcleo indólico (C_8H_9N). Assim como observado na literatura, acredita-se que a partir do cromatograma (CLAE-DAD semprep., Figura 13) e espectro de RMN, o íon molecular $[M + H]^+$ m/z 247,12 seja referente ao alcaloide β -carbolínco (flavopereirina, STEELE et al. 2002).

A partir da análise cromatográfica e espectrométrica (CLAE-DAD semipreparativo, LC-MS e RMN), foi observado que as subfrações F3F6FAGV e F3FAGS correspondem as mesmas substâncias, um alcaloide indólico ainda não descrito na literatura. As subfrações F4F6FAGV e F7F6FAGS tratam-se da mesma substância, o alcaloide β -carbolínco (flavopereirina).

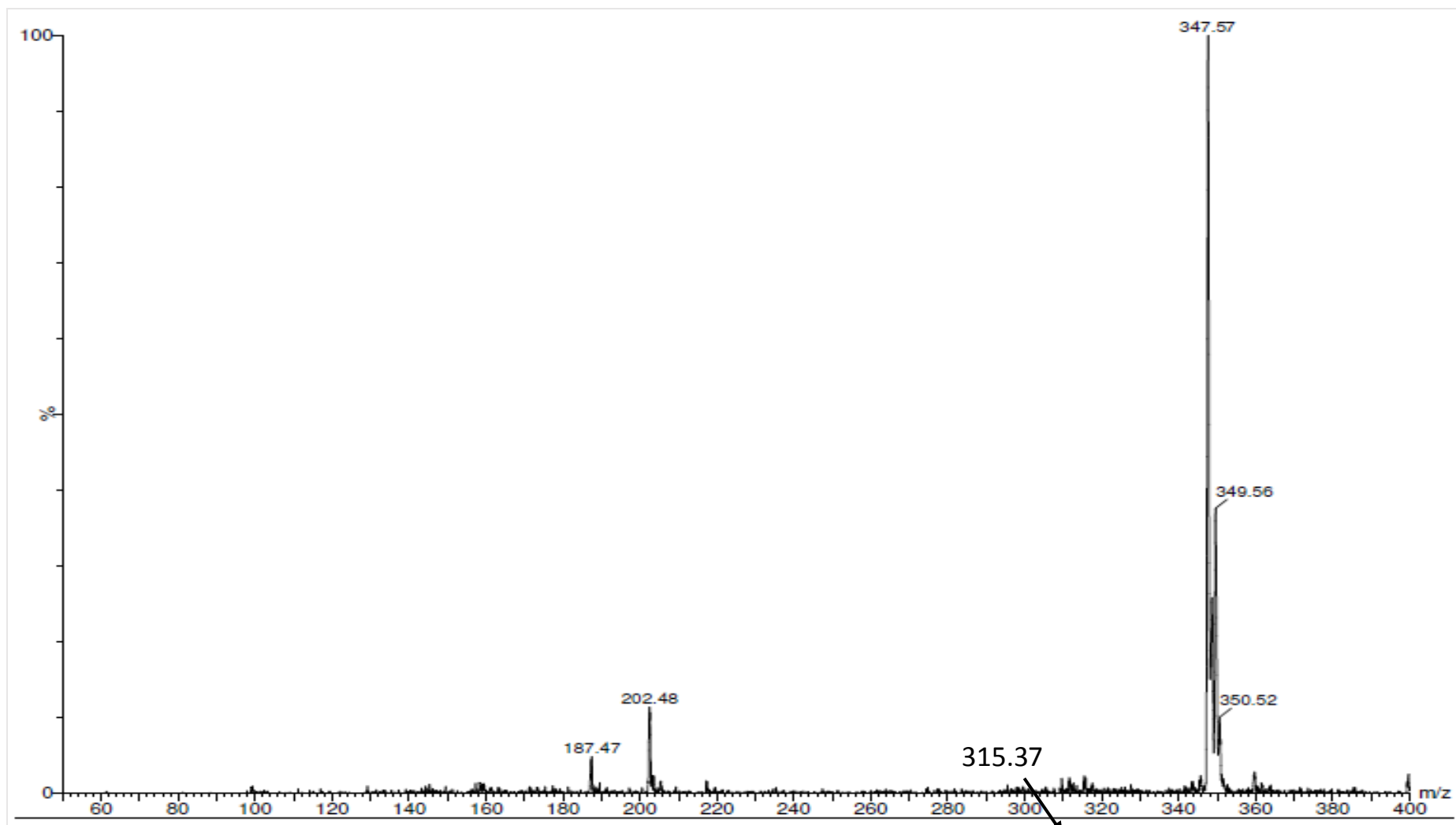


Figura 20 - Espectro de Massa de íon totais no modo positivo de ionização da subfração F3F6FAGV obtida das cascas de *G. vellosii*.

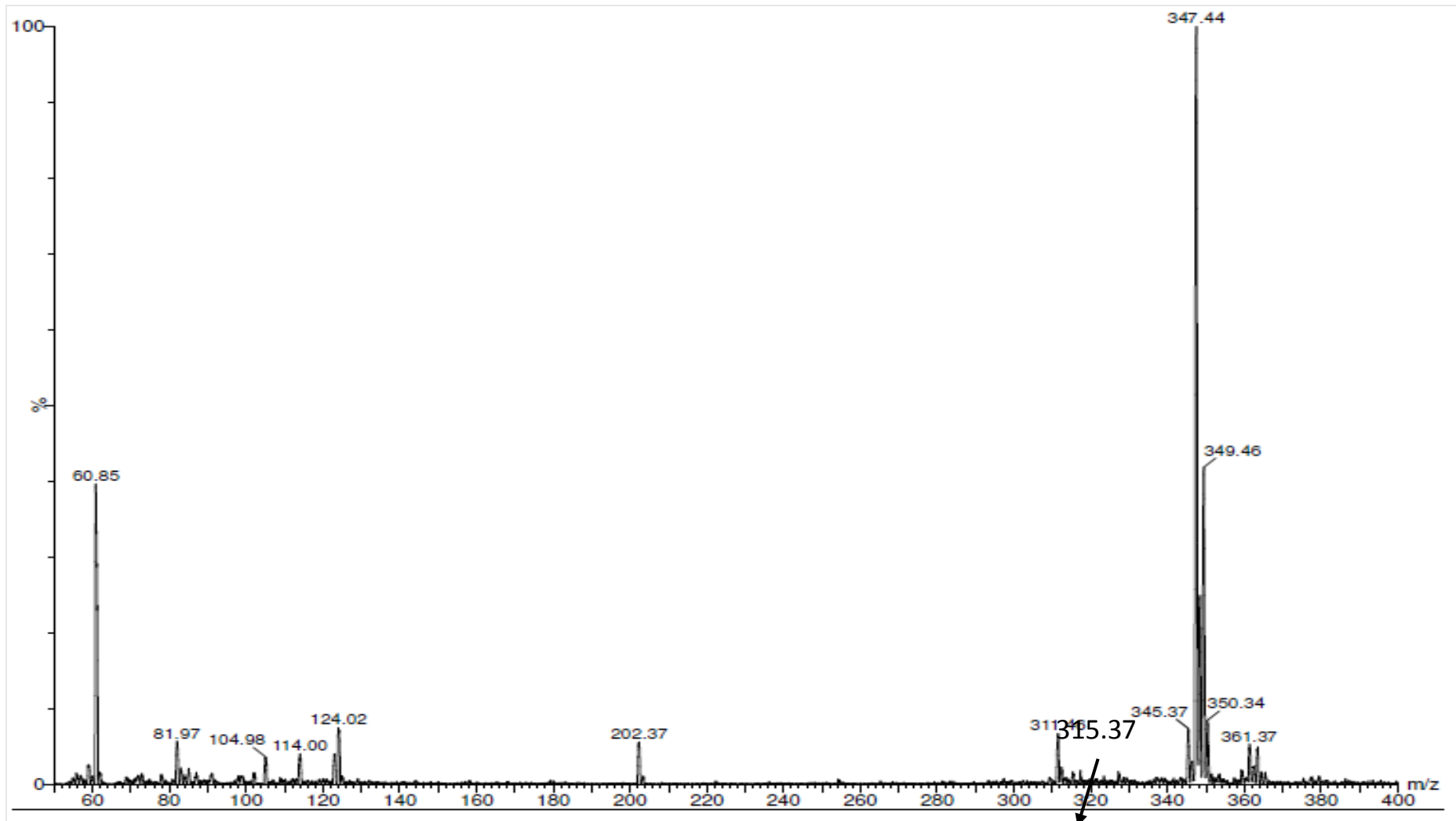


Figura 21 - Espectro de Massa de íon totais no modo positivo de ionização da subfração F3F6FAGS obtida das cascas de *G. sericeum*.

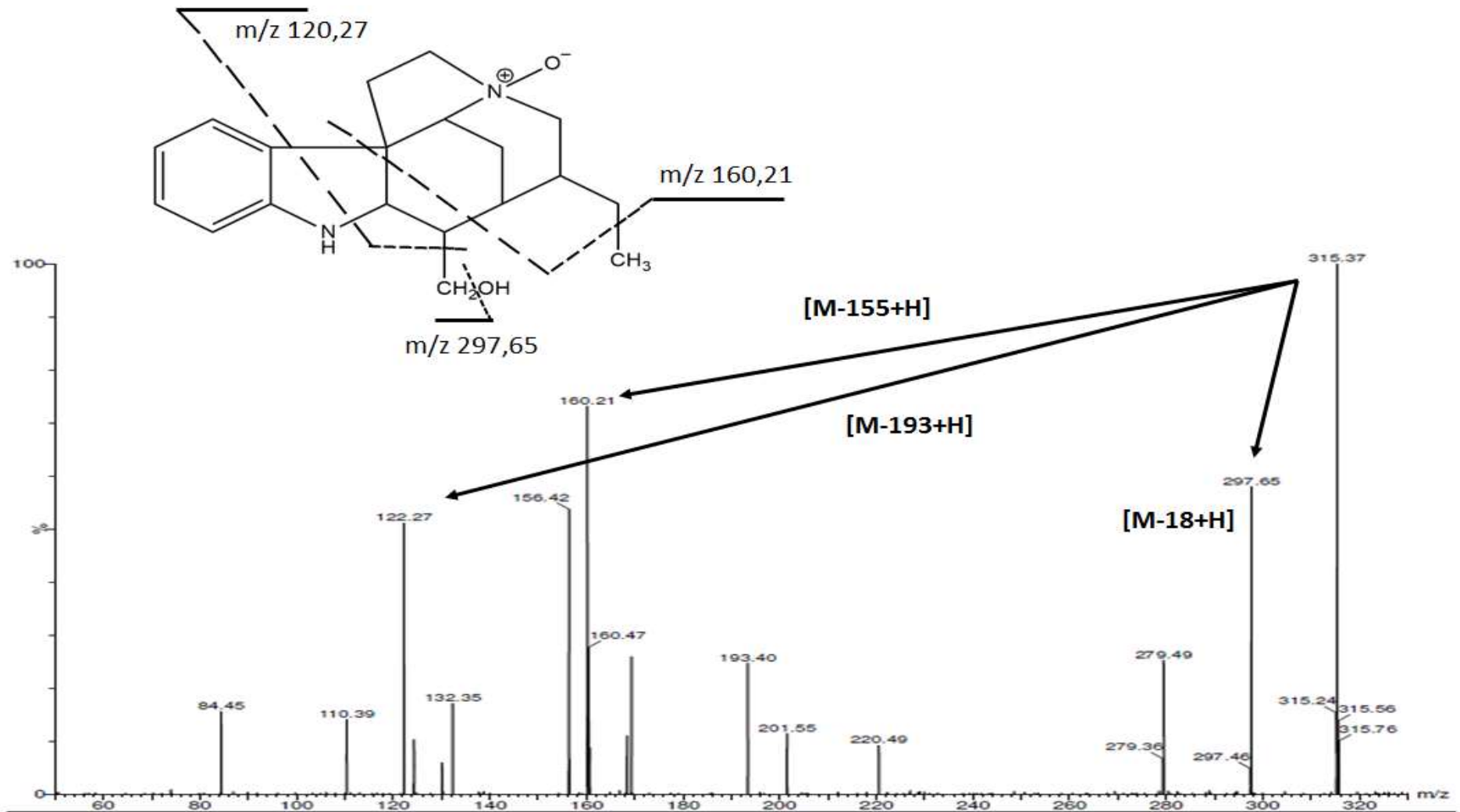


Figura 22 - Espectro de Massa de íons filhos no modo positivo de ionização da substância F3F6FAGV obtida das cascas de *G. vellosii*.

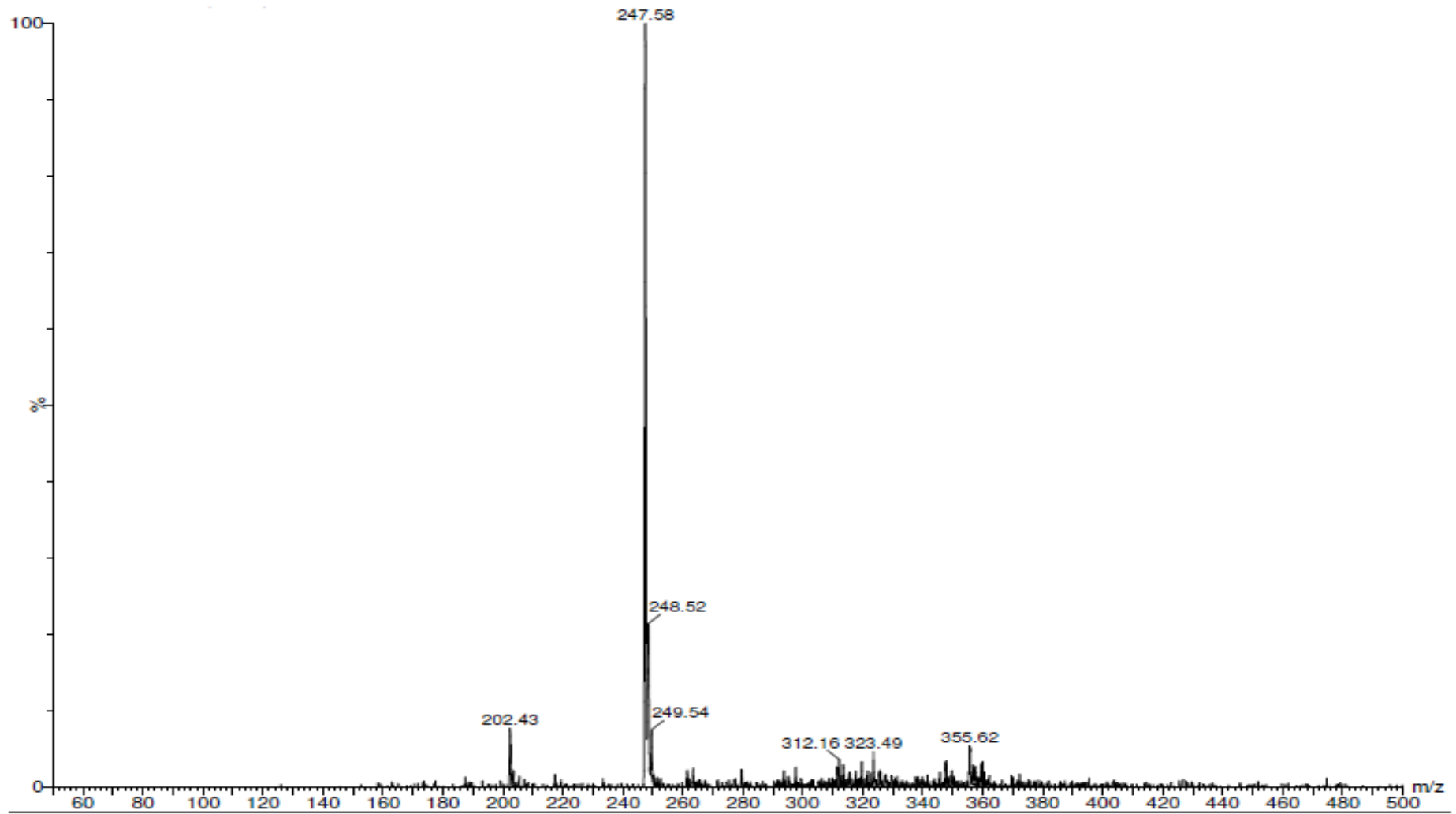


Figura 23 - Espectro de Massa de íon totais no modo positivo de ionização da substância F4F6FAGV obtida das cascas de *G. vellosii*.

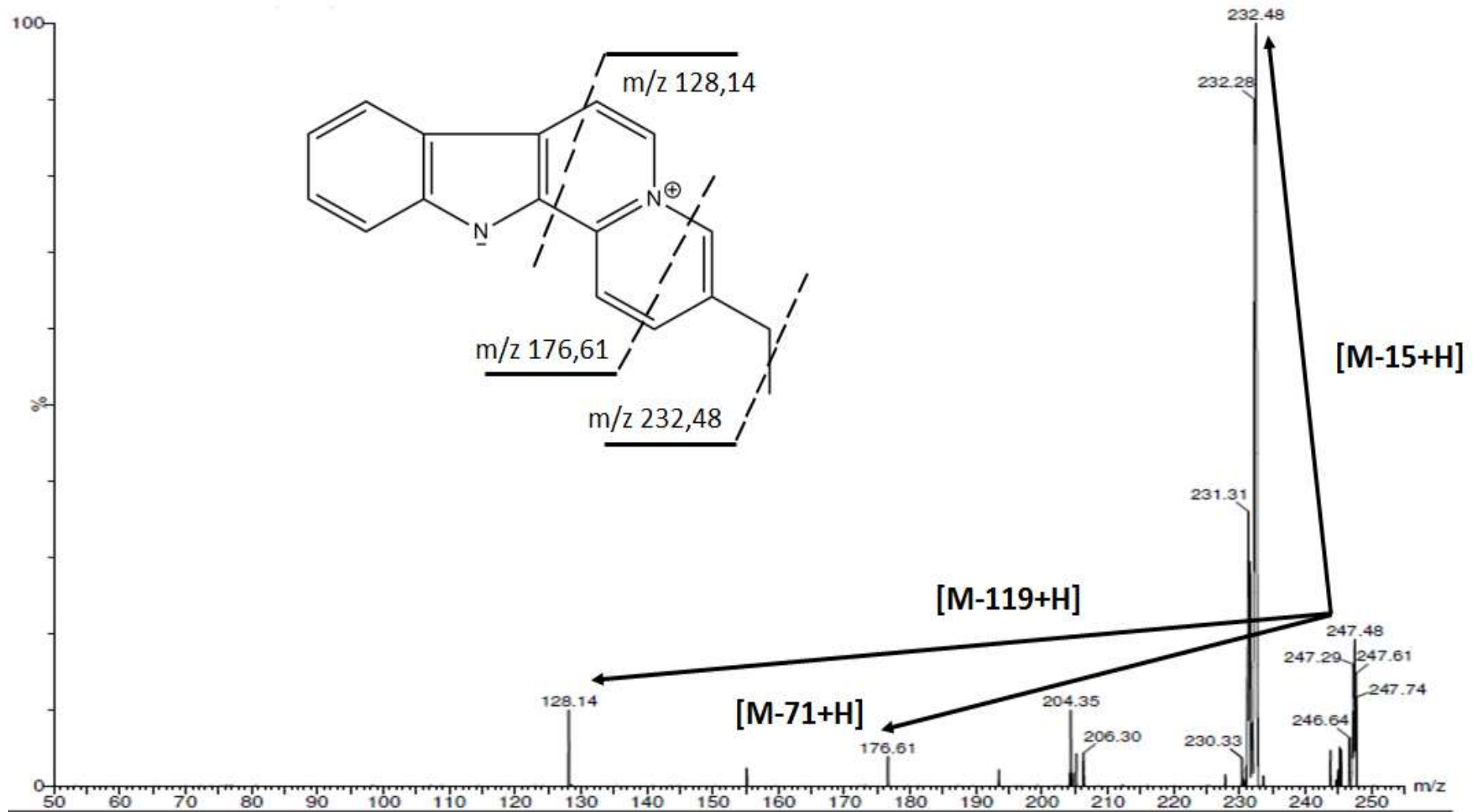


Figura 24 - Espectro de Massa de íons filhos no modo positivo de ionização da substância F4F6FAGV obtida das cascas de *G. vellosii*.

5.3. Atividade Biológica

O ensaio de atividade antileishmania foi padronizado através da elaboração da curva de crescimento das cepas de *L. amazonensis*. Através desta curva foi possível determinar a fase exponencial ou logarítmica (fase log) e a fase estacionária de crescimento dos microrganismos em cada sistema de cultivo. As formas pró-cíclicas foram definidas entre o segundo e quarto dia (fase log), as metacíclicas ocorreram a partir do quinto dia (fase estacionária), com declínio iniciando no sétimo dia, quando os parasitas começaram a morrer (Figura 25).

Durante o desenvolvimento no hospedeiro invertebrado, as formas promastigotas passam por modificações morfológicas, bioquímicas e das características relacionadas à virulência, pois evoluem para uma forma altamente infectiva para o hospedeiro vertebrado. Similarmente, no cultivo *in vitro*, as promastigotas evoluem, porém de forma menos virulenta e com alta capacidade replicativa (promastigotas de fase log), para uma forma altamente virulenta encontrada durante a fase estacionária do crescimento (promastigota metacíclico; RAMAMOORTH et al. 1992). Assim, o ensaio deve ser realizado com cultivos na fase estacionária. Desta forma, todos os ensaios antileishmania utilizaram promastigotas coletadas no quinto dia de cultura.

Ao contrário do que se imagina, na fase log os parasitos da *Leishmania* são mais arredondas, com redução na motilidade e intensa reprodução parasitária. Enquanto que promastigotas metacíclicas (fase estacionária), consideradas as formas infectivas para o hospedeiro mamífero, são mais afiladas na sua estrutura, com reduzida divisão celular, porém maior motilidade (KILLICK-KENDRICK, MOLYNEUX, ASHFORD, 1974).

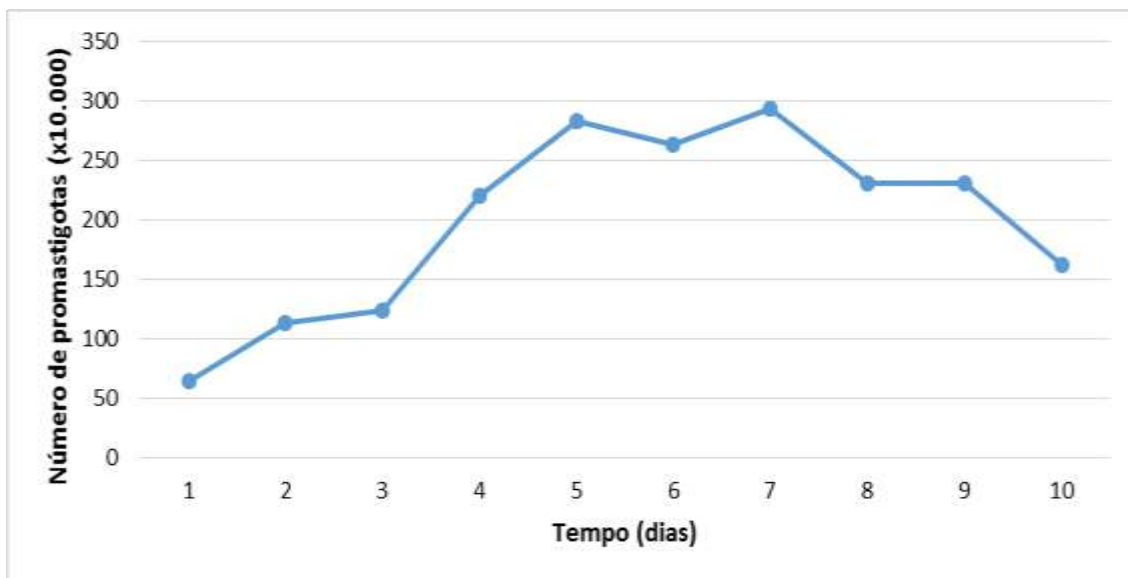


Figura 25 - Curva de crescimento das formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*.

Após a determinação da curva de crescimento do parasito, iniciaram-se os estudos de avaliação da atividade antipromastigota dos extratos, frações, subfrações e alcaloides de *G. vellosii* e *G. sericeum*. Os extratos etanólicos de *G. vellosii* (EEGV) e *G. sericeum* (EEGS) mostraram-se ativos contra promastigota de *L. amazonensis*. Quando se compara as Concentrações Inibitórias 50% (CI_{50}), observa-se que o EEGV ($CI_{50} = 13,59 \pm 0,27 \mu\text{g/mL}$; Tabela 14) apresentou uma atividade antipromastigota inferior a *G. sericeum* (EEGS, $CI_{50} = 3,92 \pm 0,15 \mu\text{g/mL}$; Tabela 15). Esta distinção nas atividades pode estar relacionada as diferenças nas constituições químicas dos extratos: açúcares redutores, proteínas e aminoácidos, alcaloide, catequinas, saponinas, heterosídeos flavônicos e polifenóis (*G. vellosii* - BRANDÃO, 2012); alcaloide, flavonóide, tanino e saponina (*G. sericeum* - SAITO et al. 2006). Além de apresentarem diferenças nos teores de alcaloides (CAMARGO et al. 2013).

Quanto ao tempo de exposição, observou-se elevada atividade antipromastigota em 24h de exposição do parasito aos extratos, com declínio após 48h e “resgate” da atividade inibitória após 72h (Tabela 14 e 15). Isto sugere que a ligação da substância ativa ao seu receptor é fraca e portanto reversível e provavelmente “leishmanioestática”. Resultados semelhantes (maior atividade em 24h) foram observados para a maioria das frações (Tabela 14 e 15).

A premissa original deste trabalho associa os alcaloides a atividade antipromastigota dos extratos. Logo, a obtenção de frações contendo maiores teores de alcaloides ou o isolamento dos mesmos contribuiria positivamente para a atividade. De acordo com a literatura, as espécies pertencentes ao gênero *Geissospermum* podem possuir alcaloides bisindólicos (RAPOPORT et al. 1958; RAPOPORT e MOORE, 1962; CHIARONI e RICHE, 1979; ALMEIDA et al. 2009; MBEUNKUI; GRACE; LILA, 2012; REINA et al. 2012), porém estes podem ter suas estruturas químicas alteradas na presença de pH ácido (RAPOPORT et al. 1958), por isso, optou-se por testar frações obtidas da extração sob refluxo (alcaloides bisindólicos, se presentes, não estariam alterados) e frações obtidas pela extração ácido-base (alcaloides bisindólicos com estruturas químicas alteradas).

A extração sob refluxo do extrato de *G. vellosii* levou a obtenção de 4 frações com diferenças e similaridades nos perfis de atividade inibitória frente à promastigotas de *L. amazonensis*. A fração hexânica (FrHexGV) foi a menos promissora e sua atividade foi observada apenas após 24h de exposição (Tabela 14, Figura 26). Esta fração provavelmente contém substâncias de baixa polaridade com ausência de alcaloides, o que justifica a baixa atividade antipromastigota.

A fração diclorometano (FrDcmGV) mostrou-se promissora como antipromastigota, porém apresentou um perfil de atividade tempo dependente semelhante ao extrato da espécie, atividade após 24h de exposição dos parasitos ao tratamento, declínio em 48h e aumento do efeito em 72h (Tabela 14, Figura 26). A FrDcmGV, provavelmente, contém os alcaloides em maiores teores que o extrato, isto pode justificar a redução das CI_{50} . Em termos químicos, esta fração pode conter alcaloides: indólicos, bisindólico e β -carbólico.

As frações FrAcOETGV (24h CI_{50} = 12,32 \pm 0,69; 48h CI_{50} = 82,06 \pm 0,26; 72h CI_{50} = 88,61 \pm 0,20) e FrMeOHGV (24 h CI_{50} = 1,71 \pm 0,15; 48h CI_{50} = 3,75 \pm 0,52; 72h CI_{50} = 5,95 \pm 0,66) apresentaram elevada atividade inibitória após 24h de tratamento, sendo que o aumento de tempo contribuiu de forma negativa. De todas as frações obtidas pela extração sob refluxo, a fração metanólica foi a mais ativa. Quando se avalia resposta x tempo, a FrMeOHGV mostrou um perfil diferente do extrato de *G. vellosii* e da fração

diclorometano (FrDcmGV; Tabela 14, Figura 26), esta fração provavelmente deve ser constituída por compostos de maior polaridade e os alcaloides, presentes, são alcaloides mais polares que os de FrDcmGV. Em síntese, todas as frações demonstraram efeito “reversível” da atividade, sugerindo uma resposta “leishmanioestática”, sendo a fração diclorometano e metanólica as mais promissoras.

O extrato etanólico de *G. vellosi*, conforme dito anteriormente, foi submetido à partição ácido-base, para a obtenção de fração com baixos teores de alcaloide (Fração de Neutros - FNGV) e outra com teores elevados de alcaloides (Fração alcaloídica - FAGV). A FNGV foi ativa em promastigota de *L. amazonensis*, com aumento da atividade em 48h, com resposta sustentada até 72h. A FAGV foi ativa em todos os tempos avaliados, porém o efeito mais pronunciado foi observado após 72h de exposição dos parasitos a fração (Tabela 14, Figura 26).

Comparando as respostas observadas para FNGV e FAGV sugere-se que a resposta observada em FNGV está relacionada a uma substância química que não seja alcaloide. Acredita-se, portanto, semelhante a fração de neutros de *A. parvifolium* (família Apocynaceae) que continha terpeno (JÁCOME et al. 2004), este metabólito apresentar atividade antipromastigota (SAUVAIN et al. 1996; CAMACHO et al. 2000), talvez a atividade antipromastigota de FNGV pode estar relacionada a terpenos.

Em síntese, os fracionamentos pelos métodos de extração e partição ácido-base contribuíram para a obtenção de frações mais ativas sobre promastigota de *L. amazonensis*. As frações mais promissoras foram FrDcmGV, FrMeOHGV e FAGV, porém a FAGV apresentou melhor resposta tempo dependente, por isso foi selecionada para o fracionamento. O fracionamento de FAGV levou a obtenção de uma subfração F6FAGV com maior efeito inibitório em 24h e efeito semelhante em 72h (Tabela 14, Figura 26). Desta subfração foram isolados os alcaloides β -carbolínico (flavopereirina) e alcaloide indólico.

Tabela 14 - Avaliação antipromastigota do extrato e frações de *G. vellosii*.

Método	Amostra	<i>Leishmania (L.) amazonensis</i>			
		CI ₅₀ (µg/mL)			
		<i>G. vellosii</i>	24h	48h	72h
Maceração exaustiva	EEGV	13,59 ± 0,27	29,57 ± 0,83	14,71 ± 0,70	
	FrHexGV	84,31 ± 0,50	> 200	> 200	
Extração sob refluxo	FrDcmGV	5,56 ± 0,70	20,85 ± 0,25	10,06 ± 0,80	
	FrAcOETGV	12,32 ± 0,69	82,06 ± 0,26	88,61 ± 0,20	
	FrMeOHGV	1,71 ± 0,15	3,75 ± 0,52	5,95 ± 0,66	
Partição ácido-base	FNGV	34,59 ± 0,83	21,98 ± 0,19	22,98 ± 0,91	
	FAGV	6,22 ± 0,25	10,19 ± 0,18	1,07 ± 0,24	
	F6FAGV	1,56 ± 0,16	31,50 ± 0,76	1,24 ± 0,15	

Legenda: CI₅₀: Concentração Inibitória 50%; GV: *Geissospermum vellosii*; EEGV - Extrato Etanólico; FNGV – Fração de Neutros; FAGV – Fração Alcalóidica - FrHexGV – Fração Hexânica; FrDCMGV – Fração Diclorometano; FrAcOEtGV – Fração Acetato de Etila; FrMeOHGV – Fração Metanólica.

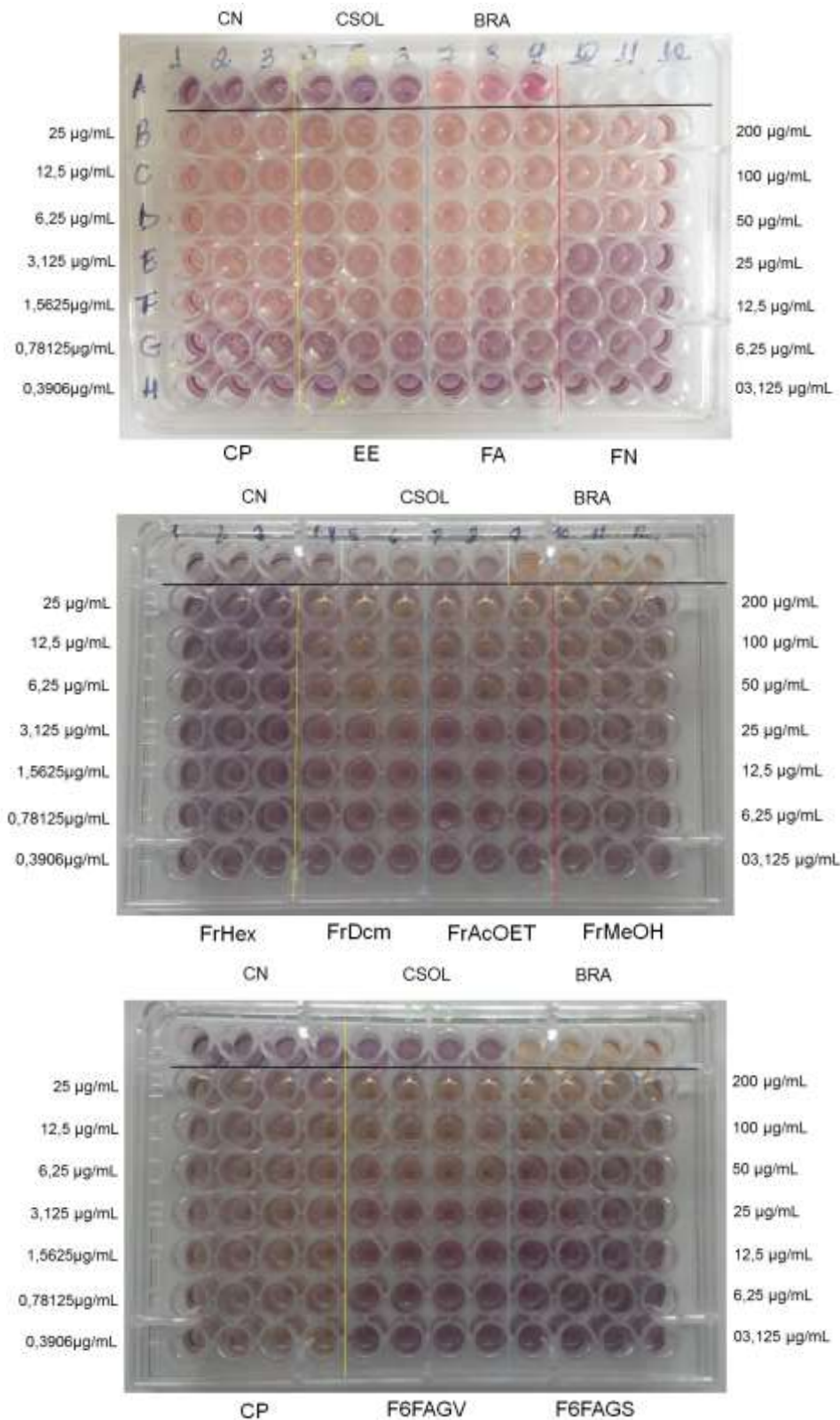


Figura 26 - Atividade antipromastigota do extrato etanólico e frações obtidos das cascas de *G. vellosii* contra *L. amazonensis*.

Legenda: CN: Controle negativo; CSOL: controle do solvente (metanol); BRA: Branco; CP: Controle positivo (Anfotericina B); EE: Extrato Etanólico; FA: Fração Alcaloidica; FN: Fração de Neutro; FrHex: Fração Hexânica; FrDcm: Fração Diclorometano; FrAcOET: Fração Aceto de Etila; FrMeOH: Fração Metanólica; F6FAGV: subfração 6 da Fração Alcaloidica de *G. vellosii*; F6FAGS: subfração 6 da Fração Alcaloidica de *G. sericeum*.

Estudos químico e biológico, semelhante ao realizado com *G. vellosii*, foram realizados com a *G. sericeum*. O EEGS apresentou elevada atividade inibitória contra formas promastigota (24h $CI_{50} = 3,92 \pm 0,15 \mu\text{g/mL}$ e 72h $CI_{50} = 14,71 \pm 0,70 \mu\text{g/mL}$), com efeito inibitório reduzido na avaliação de 48h ($CI_{50} = 34,34 \pm 0,13 \mu\text{g/mL}$; Tabela 15; Figura 27). Estes resultados levam a crer que os alcaloides, apesar de promissores para leishmania, tenham efeito “leishmanioestático”.

A FrHexGS apresentou efeito inibitório sobre as promastigotas de *L. amazonensis* em todos os tempos analisados, porém a melhor resposta ocorreu em 72h ($CI_{50} = 46,33 \pm 0,90 \mu\text{g/mL}$). Fato semelhante foi observado para a FNGS, na qual o tempo de exposição contribuiu para a atividade antipromastigota (72h $CI_{50} = 5,33 \pm 1,81 \mu\text{g/mL}$; Tabela 15; Figura 27). Os resultados sugerem que estas amostras contenham substâncias, de caráter apolar, responsável pela atividade antipromastigota. Até o presente, nenhum estudo químico de FNGS foi realizado.

As frações de *G. sericeum*, que devem possuir maiores teores de alcaloides, são FrDcmGS e FAGS. A FrDcmGS apresentou efeito inibitório elevado sobre os parasitos em 24h ($CI_{50} = 3,92 \pm 0,67 \mu\text{g/mL}$), enquanto que a melhor resposta antipromastigota de FAGS foi observada em 72h ($CI_{50} = 0,99 \pm 0,21 \mu\text{g/mL}$; Tabela 15; Figura 27). Estas repostas podem estar relacionadas com composições químicas diferentes, isto é, a FrDcmGS pode conter os alcaloides bisindólicos e a FAGS os alcaloides indólicos e β -carbolicos (BASTOS, 2016). A provável diferença nos teores de alcaloides presentes nas frações também pode servir de explicação para estes diferentes resultados. O fracionamento de FrDcmGS seria ideal para confirmar essa hipótese. No entanto, nenhum estudo fitoquímico com CLAE-DAD ou LC-MS comparando estas duas frações foi realizado.

As frações FrAcOETGS e FrMeOHGS foram ativas em todas as avaliações realizadas, porém em 24h obteve-se uma menor CI_{50} (Tabela 15; Figura 27). A FrMeOHGS, revelou-se positiva para alcaloides, estes alcaloides devem possuir maior polaridade.

Semelhante a *G. vellosii*, as frações mais promissoras de *G. sericeum* foram FrDcmGS e FAGS, porém o melhor efeito tempo dependente ocorreu em FAGS, sendo esta fração selecionada para os estudos químicos. No presente

estudo, o fracionamento de FAGS levou a obtenção de subfração F6FAGS com melhora na resposta antipromastigota (Tabela 15; Figura 27). Da fração F6FAGS foram isolados os mesmos alcaloides de *G. vellosi*, β -carbolínico (flavopereirina) e alcaloide indólico. Apesar de conter os mesmos alcaloides, estas subfrações F6FAGS e F6FAGV podem conter teores diferentes destes metabólitos, portanto, isto pode ter influenciado na resposta.

Tabela 15 - Avaliação antipromastigota do extrato e frações de *G. sericeum*.

Método	Amostra	<i>Leishmania (L.) amazonensis</i>		
		CI ₅₀ (µg/mL)		
	<i>G. sericeum</i>	24h	48h	72h
Maceração exaustiva	EEGS	3,92 ± 0,15	34,34 ± 0,13	5,14 ± 0,98
	FrHexGS	60,91 ± 0,69	72,41 ± 0,13	46,33 ± 0,90
Extração sob refluxo	FrDcmGS	3,92 ± 0,67	29,310 ± 0,10	28,62 ± 0,30
	FrAcOETGS	8,55 ± 0,21	24,56 ± 0,33	45,63 ± 0,50
	FrMeOHGS	5,00 ± 0,58	31,02 ± 0,55	17,97 ± 0,23
Partição ácido- base	FNGS	22,91 ± 0,67	23,24 ± 1,05	5,33 ± 1,81
	FAGS	4,22 ± 0,05	7,81 ± 0,13	0,99 ± 0,21
	F6FAGS	3,62 ± 0,28	16,07 ± 0,03	4,40 ± 0,71

Legenda: CI₅₀: Concentração Inibitória 50%; GS – *Geissospermum sericeum*; EEGS - Extrato Etanólico; FNGS – Fração de Neutros; FAGS – Fração Alcaloídica - FrHexGS – Fração Hexânica; FrDcmGS – Fração Diclorometano; FrAcOETGS – Fração Acetato de Étila; FrMeOHGS – Fração Metanólica.

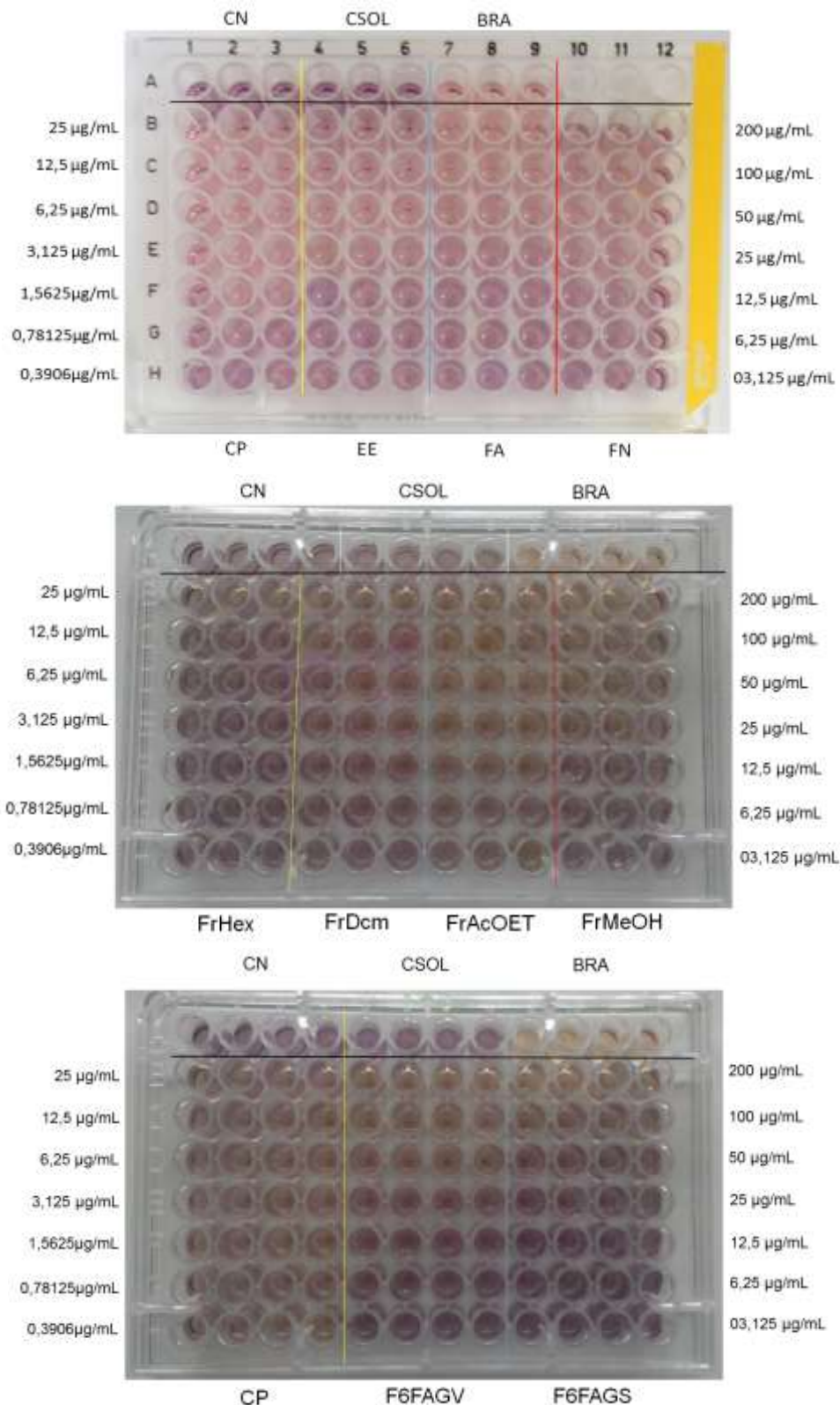


Figura 27 - Atividade antipromastigota do extrato etanólico e frações obtidos da casca de *G. sericeum* contra *L. amazonensis*.

Legenda: CN: Controle negativo; CSOL: controle do solvente (metanol); BRA: Branco; CP: Controle positivo (Anfotericina B); EE: Extrato Etanólico; FA: Fração Alcaloidica; FN: Fração de Neutro; FrHex: Fração Hexânica; FrDcm: Fração Diclorometano; FrAcOET: Fração Aceto de Etila; FrMeOH: Fração Metanólica; F6FAGV: subfração 6 da Fração Alcaloidica de *G. vellosii*; F6FAGS: subfração 6 da Fração Alcaloidica de *G. sericeum*.

Comparando-se as duas espécies de *Geissospermum*, o extrato etanólico de *G. sericeum* mostrou-se mais promissor que o extrato de *G. vellosii*. Em relação ao fracionamento, as frações de *G. sericeum* apresentaram melhor perfil de atividade antipromastigota (Tabela 16).

Tabela 16 – Análise comparativa da avaliação antipromastigota entre as espécies *G. vellosii* e *G. sericeum*.

Amostra	Atividade		
	24h	48h	72h
<i>G. vellosii</i>			
EEGV	A	A	A
FrHexGV	MMA	I	I
FrDcmGV	MA	A	A
FrAcOETGV	A	MMA	MMA
FrMeOHGV	MA	MA	MA
FNGV	MMA	A	A
FAGV	MA	A	MA*
F6FAGV	MA	MMA	MA*
<i>G. sericeum</i>			
EEGS	MA	MMA	MA
FrHexGS	MMA	MMA	MMA
FrDcmGS	MA	A	A
FrAcOETGS	MA	A	MMA
FrMeOHGS	MA	MMA	A
FNGS	A	A	MA
FAGS	MA	MA	MA*
F6FAGS	MA	A	MA

Legenda: GV: *Geissospermum vellosii*; GS – *Geissospermum sericeum*; EE - Extrato Etanólico; FN – Fração de Neutros; FA – Fração Alcaloídica - FrHex – Fração Hexanica; FrDCM – Fração Diclorometano; FrAcOET – Fração Acetato de Etila; FrMeOH – Fração Metanólica; < 10 µg/mL: muito ativo (MA); ≥ 10 a 30 µg/mL: ativo (A); 31-100 µg/mL - moderada atividade (MMA) e > 100 µg/mL inativo (I); * < 1,5 µg/mL.

Algumas vezes, o fracionamento pode contribuir nos processos metabólicos celulares culminando com possíveis dano celular, ou seja, apresentar atividade citotóxica. Desta forma, tornou-se necessário avaliar a citotoxicidade das amostras obtidas.

O extrato de *G. vellosii* e suas frações foram submetidos à avaliação de citotoxicidade em células THP-1 diferenciada em macrófagos e em células de fígado humano (HepG2). A linhagem celular THP-1 é amplamente usada como modelo experimental em estudo *in vitro* para identificação de novas substâncias com potencial atividade biológica (BANDERALI et al. 2011), um modelo bem estabelecido para “screening” para substâncias antileishmania (GEBRE-HIWOT et al. 1992). A escolha de outra linhagem, células hepatoma

(HepG2), fundamentou-se no fato desta linhagem induzir a enzima CYP450 (CHOI et al. 2015), com isso podendo metabolizar os componentes da planta, possibilitando a avaliação de sua citotoxicidade (BASTOS, 2016).

A extração sob refluxo do extrato de *G. vellosii* contribuiu para o aumento da citotoxicidade em células HepG2. No entanto, a partição ácido-base aumentou, de forma menos acentuada, a citotoxicidade desta espécie frente a linhagem THP-1. A subfração F6FAGV (24h, THP-1 $CC_{50} = 230,5 \pm 0,45 \mu\text{g/mL}$; HepG2- $CC_{50} = 415,2 \mu\text{g/mL}$) apresentou uma citotoxicidade inferior ao extrato (24h, THP-1 $CC_{50} = 178,0 \pm 0,36 \mu\text{g/mL}$; HepG2- $CC_{50} = 119,0 \pm 0,37 \mu\text{g/mL}$). O aumento do tempo de exposição da célula ao extrato ou frações contribuiu para a redução da citotoxicidade (Tabela 17).

Os possíveis mecanismos envolvidos na citotoxicidade de alcaloides indólicos são: intercalação de DNA, ocasionando cisão de cadeia simples e ligações cruzadas (ROSS, GLAUBIGER, KOHN, 1978); inibição da tirosina quinase, competindo pelo sítio de ligação do ATP (HEALY et al. 2009); inibição da Topoisomerase 2; alquilação covalente de macromoléculas e geração de radicais livres (SHI et al. 1998). Além de bloquear a polimerização dos microtúbulos (MAHIDOL et al. 1998), inibir a DNA topoisomerase I (LEE, 1999), e causar metástase (HWANG et al. 2011).

Estudos realizados com o alcaloide camptotecina apresentaram ações deste metabólito sobre enzima DNA topoisomerase I (TOP 1; BRANDÃO et al. 2010), promovendo a quebra de uma das fitas de DNA que permite o giro da fita quebrada sobre a fita intacta, de forma a reduzir a tensão torcional da molécula, inibindo a religação do DNA (EFFERTH et al. 2007). Essa tensão do DNA é causada pela replicação, transcrição e remodelagem da cromatina. Inibidores de topoisomerases agem principalmente na etapa intermediária da clivagem e a fita permanece clivada por períodos de tempo, praticamente indetectáveis. Durante a religação do DNA pelo complexo de clivagem (TOP1cc) ocorre ataque nucleofílico na ligação fosfodiéster-DNA-tirosil pelo final da fita de DNA livre, 5'-hidroxil-DNA, sendo crucial o perfeito alinhamento destes. O alcaloide consegue penetrar nas células dos vertebrados e alcançar a TOP 1, sendo reversível com a retirada da mesma, minutos após a exposição (POMMIER, 2006). Logo, acredita-se que essa ação seja a responsável pela

redução da citotoxicidade ao aumentar o tempo de exposição da célula ao extrato ou frações.

Tabela 17 - Avaliação da citotoxicidade de *G. vellosii*.

Amostra	CC ₅₀ (µg/mL)			
	Células HepG2		Células THP-1	
	24h	24h	48h	72h
<i>G. vellosii</i>				
EEGV	119,0 ± 0,37	178,0 ± 0,36	581,1 ± 0,60	829,4 ± 1,09
FrHexGV	15,0	ND	ND	ND
FrDcmGV	76,8	ND	ND	ND
FrAcOETGV	84,7	ND	ND	ND
FrMeOHGV	19,4	ND	ND	ND
FNGV	110,4	115,9 ± 0,35	514,4 ± 0,61	744,3 ± 0,23
FAGV	250,0	121,4 ± 0,29	535,4 ± 0,43	774,3 ± 0,47
F6FAGV	415,2	230,5 ± 0,45	625,7 ± 0,34	629,4 ± 0,91

Legenda: CC₅₀: Concentração Citotóxica 50%; GV: *Geissospermum vellosii*; EE - Extrato Etanólico; FN – Fração de Neutros; FA – Fração Alcaloídica - FrHex – Fração Hexânica; FrDCM – Fração Diclorometano; FrAcOET – Fração Acetato de Etila; FrMeOH – Fração Metanólica.

Avaliou-se também a citotoxicidade do extrato e frações obtidos de *G. sericeum* (Tabela 18) e alguns resultados foram muito semelhantes aos obtidos para *G. vellosii* frente a linhagem THP-1, isto é, o aumento do tempo de exposição a mostra (48h e 72h) reduziu a citotoxicidade (maior CC₅₀). Diferente da *G. vellosii*, as frações obtidas por extração sob refluxo foram menos citotóxicas que as frações obtidas por partição ácido-base, na avaliação de 24h. A fração de alcaloides de *G. sericeum* apresentou uma citotoxicidade significativa na avaliação de 24h, porém esta citotoxicidade não foi observada nos tempos de 48 e 72h (Tabela 18). Estes resultados reforçam a premissa de que a atividade destes alcaloides esteja ligada à sua ação citostática.

Tabela 18 - Avaliação da citotoxicidade de *G. sericeum*.

Amostra	CC ₅₀ (µg/mL)			
	Células HepG2		Células THP-1	
	24h*	24h	48h	72h
<i>G. sericeum</i>				
EEGS	472,5 ± 0,64	215,0 ± 0,29	648,1 ± 0,45	721,6 ± 0,57
FrHexGS	375,1 ± 0,78	ND	ND	ND
FrDcmGS	155,8 ± 0,28	ND	ND	ND
FrAcOETGS	252,0 ± 0,21	ND	ND	ND
FrMeOHGS	247,3 ± 0,42	ND	ND	ND
FNGS	259,3 ± 0,42	126,7 ± 0,15	591,6 ± 0,36	638,4 ± 0,65
FAGS	299,4 ± 0,35	57,59 ± 0,11	564,0 ± 0,42	670,1 ± 0,38
F6FAGS	869,9 ± 0,99	389,1 ± 0,37	641,4 ± 0,45	716,6 ± 0,41

Legenda: CC₅₀: Concentração Citotóxica 50%; GS – *Geissospermum sericeum*; EE - Extrato Etanólico; FN – Fração de Neutros; FA – Fração Alcaloídica - FrHex – Fração Hexânica; FrDCM – Fração Diclorometano; FrAcOET – Fração Acetato de Etila; FrMeOH – Fração Metanólica.

Os resultados obtidos demonstraram que as duas espécies estudadas são promissoras, porém a seguinte questão foi levantada: qual a espécie deve ser priorizada para as próximas etapas da pesquisa? Tentando responder esta questão determinou-se o índice de seletividade de todas as amostras (Tabela 19). Nesta tabela, observa-se que, de forma geral, o extrato de *G. sericeum* e suas frações, exceto a fração alcaloídica (FAGS), apresentaram melhores índices de seletividade. No entanto, a fração alcaloídica (FAGV) de *G. vellosii* e sua subfração (F6FAGV) foram mais seletivas. Apesar destas frações provavelmente terem maiores teores dos alcaloides, são menos citotóxicas.

A citotoxicidade de *G. vellosii* também foi avaliada em câncer de ovário, obtendo-se inibição do crescimento celular pelo extrato hidroalcoólico das cascas de *G. vellosii*, de forma tempo dependente (48h, CC₅₀= 180-235 µg/mL; YU e CHEN, 2014). É possível que esta atividade esteja relacionada a indução de apoptose. A fração alcaloídica de *G. vellosii*, reduziu de forma significativa o crescimento *in vitro* em linhagem celular de câncer de próstata humano nas concentrações de 100 ou 500 µg/mL (24, 48 e 72h; $p < 0,001$), atribuída a indução de apoptose de forma dose dependente (BEMIS et al. 2009).

Acredita-se que a fração alcaloídica de *G. vellosii* afeta o crescimento celular, em especial os alcaloides β-carbolínicos, com supressão da atividade das proteínas quinases dependentes de ciclina (CDK, *cyclin-dependent protein kinase*; CAO et al. 2007). Estas proteínas são ativadas por ligação com uma

molécula reguladora positiva, a ciclina; ou por fosforilação de um resíduo de treonina (Thr 160 em CDK2) localizado na alça conhecida como segmento de ativação. O núcleo catalítico da proteína CDK2 é composto de múltiplos subdomínios encontrados em todas as proteínas quinases. Com isso, ao inibir a ativação dessas proteínas, acredita-se que ocorra supressão da divisão celular ou indução da morte celular (BEMIS et al. 2006; BEMIS et al. 2009).

Em outro estudo, o extrato enriquecido com alcaloides β -carbolínicos das cacas de *G. vellosii* foi capaz de reduzir o crescimento celular e induzir a apoptose em células do câncer de próstata metastático de forma tempo dependente (72h, CC_{50} = 122,08 μ g/mL). Observou-se que o extrato diminuiu a fosforilação ativa da proteína AKT em Ser473 e NFkB/p65 em Ser536. Além das proteínas alvo NF-kB bem conhecidas, ciclina D1, bem como a Bcl-2, Bcl-xL, e de XIAP, envolvida na proliferação celular e sobrevivência, também suprimi genes alvo de NF-kB, tais como Fator de crescimento vascular endotelial (VEGF-A) e Metaloproteinases da matriz (MMP-9), envolvida na metástase. Também inibe significativamente a atividade de ligação NF-kB/RelA/p65 de DNA e sua transcrição. Todos os dados sustentam a hipótese de que esse extrato suprime a via de sinalização de NF-kB, através da inibição do fator de transcrição NF-kB (κ B; CHANG et al. 2014).

No tratamento do câncer podem ser usados os alcaloides bisindólicos (vimblastina e vincristina) e o alcaloide indólico elipticina. Apesar de pertencerem à mesma classe química, estes fármacos possuem mecanismos de ação diferentes. A vimblastina bloqueia a mitose em metáfase, fixando-se sobre as subunidades α e β da tubulina, na fase S do ciclo celular, impedindo a sua polimerização e a formação de microtúbulos do fuso, além de reduzir a biossíntese dos ácidos nucléicos nas células tumorais e diminuir a produção de energia celular, inviabilizando a divisão celular (HAIT et al. 2007). Enquanto que as elipticinas podem interagir com o DNA por intercalação (POLJAKOVÁ et al. 2007) ou inibição da Topoisomerase 2, podendo interromper o ciclo celular por regulação da expressão de algumas quinases, tais como ciclina B1 e Cdc2. Além disso, podem agir através da fosforilação dessa última ciclina, induzindo a apoptose e geração de radicais livres citotóxicos (KUO et al. 2006).

Os mecanismos de ação dos alcaloides precisam ser elucidados, mas acredita-se que a obtenção de frações ricas nestes metabólitos (indólicos, beta-carbolínicos e bisindólicos) possam ter efeitos antitumorais

No presente estudo, o alcaloide indólico e β -carbolínico (Tabela 21), frações ricas em alcaloides (FNGV, FAGv, F6FAGV; Tabela 19) apresentaram efeitos citotóxicos moderados para as células THP-1. No entanto, frações extraídas sob refluxo, com provável presença de alcaloides bisindólicos, mostraram elevada citotoxicidade (Tabela 17; BASTOS, 2016).

Tabela 19 – Análise comparativa em diferentes tempos de avaliação.

Amostras	<i>G. vellosii</i>			<i>G. sericeum</i>			Observação
	CI ₅₀ (µg/mL)	CC ₅₀ (µg/mL)	IS	CI ₅₀ (µg/mL)	CC ₅₀ (µg/mL)	IS	
EE							
-24h	13,59	178,0	13,1	3,92	215,0	54,8	GS: maior atividade antipromastigota e maior seletividade
-72h	14,71	829,4	56,4	5,14	721,6	140,4	
FrHex							
-24h	84,305	375,15	4,5	60,91	375,15	6,2	Frações pouco promissoras: atividade reduzida e baixa seletividade (<10)
-72h	> 200	-	-	46,33	-	-	
FrDcm							
-24h	5,556	76,85	13,8	3,92	155,8	39,7	GS: mais promissora
-72h	10,056	-		28,62	-	-	
FrAcOET							
-24h	12,32	84,74	6,9	8,55	252,05	29,5	GS: mais promissora
-72h	88,61	-	-	45,63	-	-	
FrMeOH							
-24h	1,707	19,4	11,4	5,00	247,3	46,5	Maior atividade da fração de GV e maior seletividade da fração de GS
-72h	5,954	-	-	17,96	-	-	
FN							
-24h	34,59	115,9	3,35	22,91	126,7	5,5	Atividade antipromastigota e seletividades semelhantes
-72h	6,22	744,3	119,6	5,33	638,4	119,8	
FA							
-24h	6,22	121,4	19,5	4,22	57,59	13,6	Atividades antipromastigota semelhantes e maior seletividade para GV
-72h	1,07	774,3	723,6	0,99	670,1	676,9	
F6FA							
-24h	1,56	230,5	147,8	3,62	389,1	107,5	GV: maior atividade e seletividade
-72h	1,24	629,4	507,6	4,4	716,6	162,9	

Legenda: CI₅₀: Concentração Inibitória 50%; CC₅₀: Concentração Citológica 50%; IS: Índice de Seletividade; EE - Extrato Etanólico; FN – Fração de Neutros; FAGS – Fração Alcaloídica - FrHex – Fração Hexânica; FrDcm – Fração Diclorometano; FrAcOET – Fração Acetato de Etila; FrMeOH – Fração Metanólica. < 10 µg/mL: muito ativo (MA); ≥ 10 a 30 µg/mL: ativo (A); 31-100 µg/mL - moderada atividade (MMA) e > 100 µg/mL inativo (I); * < 1,5 µg/mL.

Outro estudo avaliou a citotoxicidade do extrato etanólico e frações obtidas das cascas de *G. sericeum*, a partir dos métodos de extração sob refluxo e por partição ácido-base, frente a linhagens celulares de origem renal (VERO) e hepática (HepG2), no qual observou-se que as frações obtidas por extração sob refluxo apresentaram elevada citotoxicidade para células de origem renal e menor citotoxicidade para as células hepáticas (HepG2; Tabela 20; BASTOS, 2016).

O alcaloide bisindólico, vimblastina é lentamente eliminado por via renal, com os seguintes feitos tóxicos: destruição celular rápida, resultando no aumento do catabolismo de purinas, elevação do ácido úrico e nefrotoxicidade (DYNAMED, 2016). Estas informações reforçam a hipótese de que as frações extraídas sob refluxo possam conter alcaloides bisindólicos.

Quando se relaciona a citotoxicidade a atividade antipromastigota, todas as frações obtidas sob refluxo parecem não ser promissoras, devido IS inferior a 10 (célula VERO), sugerindo presença de constituintes com elevado potencial nefrotóxico.

Na partição ácido-base obteve-se uma fração mais seletiva (menor citotoxicidade para as células renais) que o extrato, a fração alcaloídica (FAGS). No entanto, o extrato apresentou maior seletividade para células hepáticas que a fração FAGS (Tabela 20).

Da fração de alcaloides de *G. sericeum* foram isolados os alcaloides indólico e β -carbolínico (flavopereirina). Atualmente existem 2 alcaloides indólicos, isolados de espécies pertencentes a família Apocynaceae, cujas atividades antitumorais já foram comprovadas: elipticina e olivacina (OLIVEIRA, 2009; HENRIQUE; NUNOMURA; POHLIT, 2010). Estudos anteriores demonstraram certa seletividade da elipticina e dos seus derivados para células tumorais de linhagem do Sistema Nervoso Central (ACTON et al. 1994; ANDERSON; GOPALSAMY; REDDY, 1994; JURAYI et al. 1994; SHI et al. 1998).

Além disso, estes alcaloides são heterocíclicos contendo o nitrogênio e podem apresentar uma potente inibição do CYP (enzimas citocromo P450, presentes em especial no fígado) por interagir com o ferro (férico ou ferroso) do CYP. A elipticina e seu derivado 9-hidroxi-elipticina têm sido usados com sucesso como inibidores da CYP1A1 e CYP1A2 (LESCA et al. 1979). Fato semelhante pode estar ocorrendo com os alcaloides de *G. sericeum*, estes podem ser metabolizados pelo fígado e interferir no metabolismo de outros fármacos.

Ao analisar todos os resultados da *G. sericeum* fica claro que a forma de fracionamento utilizada interfere na citotoxicidade e na atividade antipromastigota, sendo a melhor estratégia de fracionamento a partição ácido-base. Devido o menor potencial antipromastigota das frações extraídas sob refluxo, estas não foram submetidas a estudos fitoquímicos.

Tabela 20 – Avaliação citotóxica e inibitória do extrato e frações de *G. sericeum*.

Amostras	CC ₅₀ (µg/mL)	CI ₅₀ (µg/mL)		CC ₅₀ (µg/mL)	CI ₅₀ (µg/mL)	
	VERO*	LA	IS	HepG2*	LA	IS
EEGS	113,6	3,92	28,98	472,5	3,92	120,5
FrHexGS	9,86	60,91	0,16	375,1	60,91	6,16
FrDcmGS	10,48	3,92	2,67	155,8	3,92	39,7
FrACoETGS	16,84	8,55	1,97	252,05	8,55	29,5
FrMeOHGS	6,81	5,00	1,36	247,3	5,00	49,46
FNGS	130,1	22,91	5,68	259,3	22,91	11,31
FAGS	173,3	4,22	41,1	299,4	4,22	70,95

Legenda: *Bastos, 2016; LA: *L. amazonensis*; GS – *Geissospermum sericeum*; EEGS - Extrato Etanólico; FNGS – Fração de Neutros; FAGS – Fração Alcaloídica - FrHexGS – Fração Hexânica; FrDcmGS – Fração Diclorometano; FrAcOETGS – Fração Acetato de Etila; FrMeOHGS – Fração Metanólica.

Visando identificar o alcaloide com atividade antileishmania, a flavopereirina e o alcaloide indólico (F3F6FAGV) foram submetidos à avaliação da atividade antipromastigota (Tabela 21). Quando comparado com os extratos etanólico e frações de alcaloides de *G. vellosii* e *G. sericeum*, observou-se que o alcaloide indólico (F3F6FAGV) apresentou menor atividade inibitória sobre a forma promastigota. Este resultado sugere que alcaloide não seja o constituinte envolvido na atividade antipromastigota.

A flavopereirina também foi submetida ao ensaio contra as formas promastigota de *L. amazonensis*, sendo este alcaloide considerado muito ativo. Logo, o principal alcaloide responsável pela atividade antipromastigota de *G. vellosii* e *G. sericeum* é a flavopereirina. Outro estudo avaliou a atividade antimalárica de alcaloides indólicos e β-carbolínico (flavopereirina) isolados de *G. sericeum* e obteve resultado semelhante, isto é, o alcaloide mais promissor foi a flavopereirina (STEELE et al. 2002).

A flavopereirina e o alcaloide indólico mostraram-se pouco tóxicos para as células THP-1. O aumento do tempo de exposição reduziu a citotoxicidade (Tabela

21). O alcaloide coralina inibe as topoisomerasas I e II, apresenta atividade antileishmania e antitumoral, no entanto estas atividades são concentração dependentes. Sugere-se, com isso, que a flavopereirina possa se comportar de forma semelhante a coralina. Assim sendo, a flavopereirina em baixas concentrações apresenta elevada atividade antipromastigota e em maiores concentrações efeito antitumoral.

Quando se compara a flavopereirina a anfotericina B, observa-se que a flavopereirina apresentou atividade similar a anfotericina B nos tempos iniciais avaliados (24-48h, $p > 0,05$; Tabela 23). No entanto, a flavopereirina apresentou capacidade inibitória maior no tempo de 72 horas ($p < 0,05$; Tabela 23), além de maior índice de seletividade em relação à anfotericina B (Tabela 21). Logo, a avaliação da atividade contra forma amastigota de flavopereirina, torna-se urgente.

O alcaloide F3F6FAGV, majoritário na planta, apresentou menor atividade que a anfotericina B e menor seletividade (Tabela 21), não sendo promissor para o tratamento da leishmaniose.

Tabela 21 – Avaliação citotóxica e inibitória das substâncias isoladas.

Substâncias	THP-1 (CC ₅₀ µg/mL)	CI ₅₀ µg/mL	IS
F3F6FAGV			
24h	232,0 ± 0,69	78,25 ± 0,30	2,9
48h	420,6 ± 0,78	52,07 ± 0,82	8,1
72h	455,9 ± 0,29	43,53 ± 0,78	10,5
Flavopereirina			
24h	225,5 ± 0,9	0,23 ± 0,10	908,4
48h	533,3 ± 0,15	2,34 ± 0,50	227,9
72h	734,0 ± 0,86	0,15 ± 0,06	4893,3
Anfotericina B			
24h	272,7 ± 0,09	0,42 ± 0,09	649,3
48h	584,6 ± 0,46	1,79 ± 0,06	326,6
72h	637,7 ± 0,72	0,35 ± 0,01	1822

Legenda: TPH-1: linguagem de células de leucemia; CC₅₀: Concentração Citotóxica 50%; CI₅₀: Concentração Inibitória 50%; IS: Índice de Seletividade; F3F6FAGV – subfração; Anf B – Anfotericina B.

Alguns autores (MARCUCCI, 1996; RIOS; RECIO; VILLAR, 1987; BIRDI et al. 2010; DIAS, 2012) alegam que a atividade medicinal de uma planta se deve ao efeito sinérgico de seus constituintes. Então, visando avaliar a existência de sinergismo para atividade antipromastigota, realizou-se um estudo com diferentes concentrações de flavopereirina associada ao alcaloide indólico na proporção de 1:1

(25 µg/mL+ 25 µg/mL; 12,5 µg/mL+12,5 µg/mL, etc.). Após 24, 48 e 72h foram determinadas às concentrações inibitórias 50% desta associação (Tabela 22).

Tabela 22 – Avaliação citotóxica e inibitória das substâncias em associação.

Associação	THP-1 (CC ₅₀ µg/mL)	CI ₅₀ µg/mL	IS
F3F6FAGV ± Anf B			
24h	230,0 ± 0,09	0,55 ± 0,91	418,2
48h	615,0 ± 0,99	0,323 ± 0,34	1904,0
72h	640,8 ± 0,56	0,242 ± 0,94	2647,9
Flavopereirina + Anf B			
24h	487,9 ± 0,25	0,375 ± 0,22	1301,1
48h	533,3 ± 0,15	0,679 ± 0,86	785,5
72h	598,6 ± 0,89	2,627 ± 0,90	227,9
F3F6FAGV + Flavopereirina			
24h	568,8 ± 0,30	5,15 ± 0,11	110,5
48h	760,1 ± 0,95	7,96 ± 0,48	98,8
72h	640,5 ± 0,54	0,31 ± 0,71	2066,1
F3F6FAGV + Flavop. + Anf B			
24h	546,9 ± 0,13	1,44 ± 0,34	379,8
48h	690,0 ± 0,8	0,42 ± 0,33	1642,9
72h	685,5 ± 0,56	0,19 ± 0,95	3607,9

Legenda: TPH-1: linguagem de células de leucemia; CC₅₀: Concentração Citotóxica 50%; CI₅₀: Concentração Inibitória 50%; IS: Índice de Seletividade; F3F6FAGV – subfração; Flavop. – Flavopereirina; Anf B – Anfotericina B.

A associação da flavopereirina ao alcaloide indólico não contribui para a atividade antipromastigota, ao contrario, reduziu de forma significativa a atividade da flavopereirina (24-48h, $p < 0,05$; Tabela 23). Também não houve sinergismo para a citotoxicidade e a seletividade foi elevada. Estes resultados reafirmam a hipótese que a flavopereirina seja o marcador farmacológico de *G. sericeum* e *G. vellosii*.

O alcaloide indólico (F3F6FAGV) e a flavopereirina podem possuir mecanismos de ação sobre a leishmania e a célula semelhantes. Em virtude disso, pode ocorrer competição pelo sítio de ligação, e este fato explicaria a redução da atividade antipromastigota da flavopereirina.

A anfotericina B atua ligando-se e alterando especificamente os esteróis da membrana celular da leishmania (ergosterol), o que altera sua permeabilidade e a célula perde potássio e moléculas pequenas, levando à morte do parasito (SAHA; MUKHERJEE; BHADURI, 1986; OLLIARO e BRYCESON, 1993; URBINA, 1997). Os alcaloides parecem exercer seu efeito antileishmania através da ligação com o complexo DNA topoisomerase (BRANDÃO et al. 2010). Quando se associa duas

substâncias com mecanismos de ação diferentes espera-se obter efeito sinérgico para atividade e pode ocorrer sinergismo para a citotoxicidade.

Quando se associou a anfotericina B ao alcaloide indólico (F3F6FAGV) não houve sinergismo para o efeito antipromastigota (24h e 72h, $p > 0,05$; Tabela 23) e nem para a citotoxicidade ($p > 0,05$). No entanto, a associação da anfotericina ao flavopereirina reduziu a atividade antipromastigota (72h, $p < 0,05$; Tabela 23) e sua seletividade (24-48h, $p < 0,05$). Desta forma, não se recomenda a associação.

Apesar de ter maior afinidade para o ergosterol, a anfotericina B também pode se ligar as membranas celulares ricas em colesterol dos túbulos renais, neste caso, pode ocorrer dano aos rins (FUKASAWA, 2005). Cerca de 80% dos usuários de anfotericina B convencional tem diminuição da função renal. Além disso, pode causar danos no fígado, trombocitopenia com risco de hemorragias e outros danos vasculares têm sido relatados (BERDICHEVSKI, 2003).

No estudo de Bastos (2016), a fração alcaloídica de *G. sericeum* (da qual foi isolado a flavopereirina) apresentou baixa citotoxicidade para as células renais (VERO) e células hepáticas (HepG2). Porém, a atividade da flavopereirina nestas linhagens ainda não foi avaliada. Apesar disso, a flavopereirina parece ser promissora como antileishmania e sua associação com anfotericina B ou com o alcaloide indólico não contribui para a atividade.

Tabela 23 – Avaliação da ação inibitórias das diferentes associações.

CI₅₀ (µg/mL)	CI₅₀ (µg/mL)	Valor de <i>p</i>	Observação
Flavopereirina	F3F6FAGV		
24h: 0,23 ± 0,10	24h: 78,25 ± 0,30	24h, <i>p</i> < 0,05	Flavopereirina mais ativa em todo os tempos
48h: 2,34 ± 0,50	48h: 52,07 ± 0,82	48h, <i>p</i> < 0,05	
72h: 0,15 ± 0,06	72h: 43,53 ± 0,78	72h, <i>p</i> < 0,05	
Flavopereirina	Anfotericina B		
24h: 0,23 ± 0,10	24h: 5,15 ± 0,11	24h, <i>p</i> < 0,05	Flavopereirina mais ativa no tempo 72h
48h: 2,34 ± 0,50	48h: 7,96 ± 0,48	48h, <i>p</i> < 0,05	
72h: 0,15 ± 0,06	72h: 0,31 ± 0,71	72h, <i>p</i> < 0,05	
Flavopereirina	F3F6FAGV + Flavop.		
24h: 0,23 ± 0,10	24h: 5,15 ± 0,11	24h, <i>p</i> < 0,05	Reduziu a atividade da flavopereirina, sugerindo competição pelo sítio de ligação
48h: 2,34 ± 0,50	48h: 7,96 ± 0,48	48h, <i>p</i> < 0,05	
72h: 0,15 ± 0,06	72h: 0,31 ± 0,71	72h, <i>p</i> > 0,05	
Flavopereirina	Flavop. + Anf B		
24h: 0,23 ± 0,10	24h: 0,38 ± 0,22	24h, <i>p</i> > 0,05	Redução da atividade da flavopereirina
48h: 2,34 ± 0,50	48h: 0,68 ± 0,86	48h, <i>p</i> < 0,05	
72h: 0,15 ± 0,06	72h: 2,63 ± 0,90	72h, <i>p</i> < 0,05	
Flavopereirina	F3F6FAGV + Flavop. + Anf B		
24h: 0,23 ± 0,10	24h: 1,44 ± 0,34	24h, <i>p</i> < 0,05	24h: redução da atividade da flavopereirina; 48h efeito sinérgico
48h: 2,34 ± 0,50	48h: 0,42 ± 0,33	48h, <i>p</i> < 0,05	
72h: 0,15 ± 0,06	72h: 0,19 ± 0,95	72h, <i>p</i> > 0,05	
Anfotericina B	F3F6FAGV + Anf B		
24h: 0,42 ± 0,09	24h: 0,55 ± 0,91	24h, <i>p</i> > 0,05	Não houve sinergismo
48h: 1,79 ± 0,06	48h: 0,32 ± 0,34	48h, <i>p</i> < 0,05	
72h: 0,35 ± 0,01	72h: 0,24 ± 0,94	72h, > 0,05	
Anfotericina B	Flavop. + Anf B		
24h: 0,42 ± 0,09	24h: 0,38 ± 0,22	24h, <i>p</i> > 0,05	Não houve sinergismo
48h: 1,79 ± 0,06	48h: 0,68 ± 0,86	48h, <i>p</i> < 0,05	
72h: 0,35 ± 0,01	72h: 2,63 ± 0,90	72h, <i>p</i> < 0,05	

Legenda: CC₅₀: Concentração Citotóxica 50%; CI₅₀: Concentração Inibitória 50%; IS: Índice de Seletividade; F3F6FAGV – subfração; Anf B – Anfotericina B; Flavop. – Flavopereirina; *p* valor a partir do teste “t-student”.

6 CONCLUSÃO

Os estudos farmacognósticos demonstraram que os pós das cascas de *G. vellosii* e *G. sericeum* estavam de acordo com os parâmetros preconizados pela Farmacopeia Brasileira V ed. (2010). Estudos fitoquímicos levaram ao isolamento de alcaloides indólico (F3F6FAGV) e β -carbolínico (flavopereirina), sendo a flavopereirina a responsável pela atividade “leishmaniosstática” destas espécies. Além disso, quanto maior o tempo de exposição dos macrófagos menor foi a citotoxicidade e maior a seletividade. Porém, quando se associou os dois alcaloides, ou o alcaloide a anfotericina B, observou-se que não houve sinergismo para a atividade antipromastigota. Logo, a flavopereirina parece ser mais promissora que a anfotericina.

REFERÊNCIAS

- ABRANTES, J. L. **Estudo da atividade anti-HSV-1 de terpenos isolados de algas pardas marinhas**. 2006. 81 f. Dissertação (Mestrado em Neuroimunologia) – Universidade Federal Fluminense, Instituto de Biologia, Nitéroí, 2006.
- ACTON, E. M.; NARAYANAN, V. L.; RISBOOD, P. A.; SHOEMAKER, R. H.; VISTICA, D. T.; BOYD, M. R. Anticancer specificity of some ellipticinium salts against human tumors *in vitro*. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 37, n. 14, p. 2185–2189, 1994.
- ALMEIDA, M. R.; LIMA, J. A.; DOS SANTOS, N. P.; PINTO, A. C. Pereirina: o primeiro alcaloide isolado no Brasil?. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 4, p. 942-952, 2009.
- ALMEIDA, L. S. **Produtos florestais não madeireiros em área manejada: análise de uma comunidade na região de influência da BR 163, Santarém, Estado do Pará**. 2010. 128 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) - Universidade Federal Rural da Amazônia, Programa de pós-graduação em ciências florestais, Belém, 2010.
- AMARANTE, C. B. **Estudo químico, farmacognóstico, atividade biológica e farmacológica de *Montrichardia linifera* (Arruda) Schott**. 2010. 320 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Exatas e Naturais, Belém, 2010.
- ANDERSON, W. K.; GOPALSAMY, A.; REDDY, P. S. Design, synthesis and study of 9-substituted ellipticine and 2-methylellipticinium analogues as potential CNS-selective antitumor agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 37, n. 13, p. 1955–1963, 1994.
- ANTHONY, J.; FYFE, L.; SMITH, H. Plant active components – a resource for antiparasitic agents?. **Trends in Parasitology**, v. 21, n. 10, p. 462-468, 2005.
- ANTOINE, J. C. et al. The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour *Leishmania* in murine macrophages. **Trends in Microbiology**, v. 6, n. 10, p. 392-401, 1998.
- ARAGÃO, H. B. Transmissão da leishmaniose no Brasil pelo *Phlebotomus intermedius*. **Brasil Médico**, v. 36, p. 129-130, 1922.
- AUROUSSEAU, M. M. Etude pharmacodynamique de la geissospermine alcaloide principal du *Geissospermum laeve* (Vellozo) Baillon (Apocynacées). **Annales Pharmaceutiques Francaises**, v. 19, n. 2, p. 104-116, 1960.
- BALAÑA-FOUCE, R.; REGUERA, R. M.; CUBRÍA, J. C.; ORDÓÑEZ, D. The pharmacology of Leishmaniasis. **General Pharmacology**, v. 30, n. 4, p. 435-443, 1998.

BANDEIRA, K. F. **Otimização e comparação de metodologias de extração de casearinas em *Casearia sylvestris***. 2004. 113 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química, Araraquara, 2004.

BANDERALI, U. Curcumin blocks Kv11.1 (erg) potassium current and slows proliferation in the infant acute monocytic leukemia cell line THP-1. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 28, n. 6, p. 1169-1180, 2011.

BARROSO, G. M.; PEIXOTO, A. L.; COSTA, C. G.; ICHASO, C. L. F.; GUIMARÃES, E. F.; LIMA, H. C. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**. Vol. 3. Viçosa: Imprensa Universitária da Universidade Federal de Viçosa, 1986. 326p.

BASTOS, M. L. C. **Avaliação de Citotoxicidade e Genotoxicidade de *G. sericeum***. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Pará, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Belém, 2016.

BELJANSKI, M.; BELJANSKI, M. S. Selective inhibition of in vitro synthesis of cancer DNA by alkaloids of β -carboline class. **Pathobiology**, v. 50, n. 2, p. 79-87, 1982.

BELJANSKI, M. The anticancer agent PB-100, selectively active on malignant cells, inhibits multiplication of sixteen malignant cell lines, even multidrug resistant. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, n. 1, p. 29-33, 2000.

BEMIS, D. L.; CAPODICE, J. L.; GORROOCHURN, P.; KATZ, A. E.; BUTTYAN, R. Anti-prostate cancer activity of a β -carboline alkaloid enriched extract from *Rauwolfia vomitoria*. **International Journal of Oncology**, v. 29, n. 5, p. 1065-1073, 2006.

BEMIS, D. L.; CAPODICE, J. L.; DESAI, M.; KATZ, A. E.; BUTTYAN, R. β -carboline alkaloid-enriched extract from the Amazonian rain forest tree Pao Pereira suppresses prostate cancer cells. **Journal of society for integrative oncology**. v. 7, n. 2, p. 59-65, 2009.

BERDICHEVSKI, R.H. **Nefrotoxicidade associada à anfotericina B em pacientes de baixo risco**. 2003. 66 f. Dissertação (Mestrado em Nefrologia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Porto Alegre, 2003.

BERMAN, J. Chemotherapy of Leishmaniasis: recent advances in the treatment of visceral disease. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 11, n. 6, p. 707-710, 1998.

BERTANI, S.; BOURDY, G.; LANDAU, I.; ROBINSON, J. C.; ESTERRE, Ph.; DEHARO, E. Evaluation of French Guiana traditional antimalarial remedies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 98, n. 1-2, p. 45-54, 2005.

BERTHO, A.; KOLL, M.; FEROSIE, M. I. Alkaloide der Pereiro-Rinde, IV. Über Geissospermin und Pereirin. **Chemische Berichte**, v. 91, n. 12, p. 2581-2600, 1958.

BERTHO, A.; KOLL, M. Alkaloide der Pereiro-Rinde, VI. Die Konstitution von Pereirin. **Chemische Berichte**. v. 94, n. 10, p. 2737-2746, 1961.

BEZERRA, J. L. **Avaliação da atividade leishmanicida de espécies vegetais**. 2006. 64 f. Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente) –Universidade Federal do Maranhão, Centro de Ciências Biológicas da Saúde, São Luís, 2006.

BEZERRA, J. L.; COSTA, G. C.; LOPES, T. C.; CARVALHO, I. C. D. S.; PATRÍCIO, F. J.; SOUSA, S. M.; AMARAL, F. M. M.; REBELO, J. M. M.; GUERRA, R. N. M.; RIBEIRO, M. N. S.; NASCIMENTO, F. R. F. Avaliação da atividade leishmanicida *in vitro* de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 631-637, 2006.

BIRDI, T.; DASWANI, P.; BRIJESH, S.; TETALI, P.; NATU, A.; ANTIA, N. Newer insights into the mechanism of action of *Psidium guajava* L. leaves in infectious diarrhoea. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 10, n. 33, p. 1-11, 2010.

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

BONOMINI, T. J. **Padronização de metodologia para extração do fitoconstituente majoritário das flores de *Allamanda catártica* L. (Apocynaceae)**. 2013. 34 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade do Vale do Itajaí, Programa de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Itajaí, 2013.

BOTSARIS, A. S. Plants used traditionally to treat malaria in Brazil: the archives of Flora Medicinal. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 3, n.1, p. 1-8, 2007.

BRAGA, F. G.; BOUZADA, M. L.; FABRI, R. L.; MATOS, M. O.; MOREIRA, F. O.; SCIO, E.; COIMBRA, E. S. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 2, p. 396-402, 2007.

BRANDÃO, M.G. L.; GRANDI, T.S. M.; ROCHA, T. M. M.; SAWYER, D. R.; KRETTLI, A. U. Survey of medicinal plants used as antimalarials in the Amazon. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 36, n. 2, p. 175-182, 1992.

BRANDÃO, H. N.; DAVID, J. P.; COUTO, R. D.; NASCIMENTO, J. A. P.; DAVID, J. M. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p.1359-1369, 2010.

BRANDÃO, D. L. N. "***Portulaca pilosa* L. e *Geissospermum vellosii*. Estudos Botânicos, Farmacognósticos, Fitoquímicos e Atividades Biológicas**". 2012. 176 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências da Saúde, Belém, 2012.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopeia Brasileira**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Série A. Normas e Manuais Técnicos. 2. ed., Brasília-DF: Ministério da Saúde, 2007. 182 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2. ed. atual. Brasília: Ministério da Saúde, 2010a. 180 p.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopeia Brasileira**. v. 2. Brasília: Anvisa, 2010b. 546 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Casos de Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasil, grandes regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2014**. 2014. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/fevereiro/24/LTA-Casos-14.pdf>>. Acesso em: 21 ago. 2016.

BURTON, R., **Viagem de Canoa de Sabará ao Oceano Atlântico**. Belo Horizonte: Itatiaia, 1977. 359 p.

CAMACHO, M. R.; PHILLIPSON, J. D.; CROFT, L. S.; KIRBY, G. C.; WARHURST, D. C.; SOLIS, P. N. Terpenoids from *Guarea rhopalocarpa*. **Phytochemistry**, v. 56, n. 2, p. 203-210, 2000.

CAMARGO, M. R. M. **Avaliação da atividade antimalárica e antimicrobiana de *Geissospermum argenteum* Woodson E *Minquartia guianensis* Aubl coletadas em Roraima**. 2012. 96 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Naturais) - Universidade Federal de Roraima, Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais Boa Vista, 2012.

CAMARGO, M. R. M.; AMORIM, R. C. N.; SILVA, L. F. R.; CARNEIRO, A. L. B.; VITAL, M. J. S.; POHLIT, A. M. Chemical composition, ethnopharmacology and biological activity of *Geissospermum* Allemão species (Apocynaceae Juss.). **Revista Fitos**, v. 8, n. 2, p. 73-160, 2013.

CAMARGOS, J. A. A.; SOUZA, M. R.; CORADIN, V. T. R. **Catálogo de árvores do Brasil**. Brasília-DF: IBAMA, 2001. 896 p.

CAMPOS, R. M. **Caracterização molecular de antígenos de *Leishmania (Leishmania) chagasi* potencialmente úteis no controle da leishmaniose visceral**. 2007. 114 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Recife, 2007.

CAO, R.; PENG, W.; WANG, Z.; XU, A. β -Carboline Alkaloids: Biochemical and Pharmacological Functions. **Current Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 4, p. 479-500, 2007.

CARVALHO, L. H. **Quimioterapia experimental com extratos brutos de plantas e compostos quimicamente definidos**. 1990. 146 f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) - Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Parasitologia-ICB, Belo Horizonte, 1990.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Leishmaniasis**. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/>>. Acesso em: 09 nov. 2015.

CHAN-BACAB, M. J.; PEÑA-RODRÍGUES, L. M. Plant natural products with leishmanicidal activity. **Natural Products Reports**, v. 18, n. 6, p. 674-688, 2001.

CHANG, C.; ZHAO, W.; XIE, B.; DENG, Y.; HAN, T.; CUI, Y.; DAI, Y.; ZHANG, Z.; GAO, J.; GUO, H.; YANG, J. Pao Pereira Extract Suppresses Castration-Resistant Prostate Cancer Cell Growth, Survival, and Invasion Through Inhibition of NF- κ B Signaling. **Integrative Cancer Therapies**, v. 13, n. 3, p. 249–258, 2014.

CHARMOY, M.; AUDERSET, F.; ALLENBACH, C.; TACCHINI-COTTIER, F. The prominent role of neutrophils during the initial phase of infection by *Leishmania* parasites. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2010, p. 1-8, 2010.

CHATURVEDI, P. K.; BHUI, K.; SHUKLA, Y. Lupeol: connotations for chemoprevention. **Cancer Letters**, v. 263, n. 1, p. 1-13, 2008.

CHIARONI, A.; RICHE, C. Structure and stereochemistry of indole alkaloids. Structure of geissospermine. **Acta Crystallographica Section B: Structural Science**, v. 35, p. 1820-182, 1979.

CHOI, J. M.; OH, S. J.; LEE, S. Y.; IM, J. H.; OH, J. M.; RYU, C. S.; KWAK, H. C.; LEE, J. Y.; KANG, K. W.; KIM, S. K. HepG2 cells as an in vitro model for evaluation of cytochrome P450 induction by xenobiotics. **Archives of Pharmacal Research**, v. 38, n. 5, p. 691–704, 2015.

CHUNG, B. H., LEE, J. J.; KIM, J. D.; JEOUNG, D.; LEE, H.; CHOE, J.; HA, K. S.; KWON, Y. G.; KIM, Y. M. Angiogenic activity of sesamin through the activation of multiple signal pathways. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 391, n. 1, p. 254-260, 2010.

CORDELL, G. A. **Introduction to alkaloids: A biogenetic approach**. New York: John Wiley & Sons, 1981. 1055 p.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, 1974. 646 p.

CORREIA, A. F.; SEGOVIA, J. F. O.; GONÇALVES, M. C. A.; DE OLIVEIRA, V. L.; SILVEIRA, D.; CARVALHO, J. C. T.; KANZAKI, L. I. B. Amazonian plant crude extracts screening for activity against multidrug-resistant bacteria. **European Review for Medical Pharmacological Sciences**, v. 12, n. 6, p. 369-380, 2008.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 5. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, v. 2, 1994. 1118 p.

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

CRONQUIST, A. An integrated system of classification of flowering plants. **Brittonia**, v. 34, n. 2, p. 268-270, 1981.

CUNNINGHAM, A. C. Parasitic Adaptive Mechanisms in Infection by Leishmania. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 72, n. 2, p. 132-141, 2002.

DAIGNEAULT, M.; PRESTON, J. A.; MARRIOTT, H. M.; WHYTE, M. K. B.; DOCKRELL, D. H. The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and Monocyte-Derived Macrophages. **PLoS ONE**, v. 5, n. 1, p. 1-10, 2010.

DAVID, C. V.; CRAFT, N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Dermatologic therapy**, v. 22, n. 6, p. 491-502, 2009.

DE PAULA, I. C.; PETROVICK, P. R. Desenvolvimento tecnológico de forma farmacêutica plástica contendo extrato seco nebulizado de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. Compositae (Marcela). **Caderno de Farmácia**, v. 13, n. 2, p. 143-145, 1997.

DEFILIPPS, R. A.; MAINA, S. L.; CREPIN, J. **Medicinal plants of the Guianas (Guyana, Surinam, French Guiana)**. 2004. Disponível em: <<http://botany.si.edu/bdg/medicinal/>>. Acesso em: 12 nov. 2015.

DEMICHELI, C.; FREZARD, F. Pentavalent antimonials: from chemistry to the design of new drugs. **Drug Design Reviews**, v. 2, n. 3, p. 243-249, 2005.

DESCOTEAUX, A.; TURCO, J. S. Glycoconjugates in Leishmania infectivity. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1455, n. 2-3, p. 341-352, 1999.

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

DIAS, J. F. G. **Fitoquímica e ensaios biológicos do extrato bruto etanólico, frações e substâncias isoladas provenientes das cascas de *Geissospermum vellosii* Allemão (APOCYNACEAE)**. 2012. 135 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências da Saúde, Curitiba, 2012.

DOS SANTOS, N. P. Passando da doutrina à prática: Ezequiel Corrêa dos Santos e a farmácia nacional. **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 1038-1045, 2007.

DOS SANTOS, D. Y. A. C. **Botânica aplicada: metabólitos secundários na interação planta-ambiente**. 2015. 124 f. Tese (Livre-Docência) –Universidade de São Paulo, Departamento de Botânica, São Paulo, 2015.

DYNAMED 2016. Portal Saúde Baseada em Evidências. **Vinblastine**. Disponível em: <<http://web.b.ebscohost.com/dynamed/search/basic?sid=fbca3ad5-a89c-4c33-ac7b-af5777fcb4d0%40sessionmgr103&vid=6&hid=125> > Acesso em: 10 jul. 2016.

EFFERTH, T.; LI, P. C.; KONKIMALLA, V. S.; KAINA, B. From traditional Chinese medicine to rational cancer therapy. **Trends in Molecular Medicine**, v. 13, n. 8, p. 353–361, 2007.

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

ENDRESS, M. E. Apocynaceae: Brown and now. **Telopea**, v. 10, n. 2, p. 525–541, 2004.

ENDRESS, M. E.; LIEDE-SCHUMANN, S.; MEVE, U. Advances in Apocynaceae: the enlightenment, an introduction. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 94, n. 2, p. 259-267, 2007.

FANSHAWE, D. B. **Forest Products of British Guiana. Part I. Principal Timbers**. 1. ed. Guiana: British Guiana Forestry Department, 1948. 101 p.

FERREIRINHA, J. **Indicações e contra-indicações da pereirina e seus saes nas manifestações agudas da malária**. 1884. 96 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Medicina, Rio de Janeiro, 1884.

FORATTINI, O. P. Nota sobre o encontro de leishmanias em roedores silvestres de zona endêmica de leishmaniose no Estado de São Paulo, Brasil. **Revista Paulista de Medicina**, v. 53, n. 2, p. 155, 1958.

FORZZA, R. C. (Org.). **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio - Instituto de Pesquisa do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, v. 1. 2010. 871 p.

FOURNET, A. et al. *In vitro* efficacy of oral and intralesional administration of 2-substituted quinolines in experimental treatment of new world cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania amazonensis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, n. 11, p. 2447-2451, 1996.

FRANCO, B. D. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996. 182 p.

FREITAS, J. C.; FERNANDES, M. E. B. Uso de plantas medicinais pela comunidade de Enfarrusca, Bragança, Pará. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi Ciências Naturais**, Belém, v. 1, n. 3, p. 11-26, 2006.

FUKASAWA, M. Liposomal amphotericin B. **Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi**, v.46, n.4, p.229-231, 2005.

GALUCIO, N. C. R. **Estudos Fitoquímicos, Citotoxicidade e Genotoxicidade de *Eleutherine Plicata* Herb**. 2014. 90 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências da Saúde, Belém, 2014.

GEBRE-HIWOT, A.; TADESSE, G.; CROFT, S. L.; FROMMEL, D. An in vitro model for screening antileishmanial drugs: the human leukaemia monocyte cell line, THP-1. **Acta Tropica**, v. 51, n. 3-4, p. 237-245, 1992.

GENARO, O.; REIS, A. B. Leishmaniose tegumentar americana. In: NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 47-64.

GONÇALVES, D. C. M. **Estrutura de ecossistemas florestais sucessionais e ecossistemas remanescentes com predomínio de *Attalea maripa* (Aubl.) Mart. e *Astrocaryum aculeatum* G. Mey e a comercialização de produtos não-madeireiros na região do Baixo Rio Tapajós, Amazônia Oriental**. 2010. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) - Universidade Federal Rural da Amazônia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais, Belém, 2010.

GOMES, J. P. M. **Pesquisa de atividade antitumoral e mutagênica *in vitro* de produtos naturais**. 2008. 86 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Ciências da Saúde, Araraquara, 2008.

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) - Universidade Federal de Santa Maria, Programa de Pós-Graduação em Química, Santa Maria, 2003.

GRIMALDI JUNIOR, G.; TESH, R. B.; McMAHON-PRATT, D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the new world. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 41, n. 6, p. 687-725, 1989.

HAIT, W. N.; RUBINA, E.; ALLI, E.; GOODINA, S. Tubullin targeting agents. **Update Cancer Therapeutics**, v.2, p. 1-18, 2007.

HANDMAN, E.; BULLEN, D. V. R. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. **Trends in Parasitology**, v. 18, n. 8, p. 332-334, 2002.

HEALY, S. J.; GORMAN, A. M.; MOUSAVI-SHAFAEI, P.; GUPTA, S.; SAMALI, A. Targeting the endoplasmic reticulum-stress response as an anticancer strategy. **European Journal of Pharmacology**, v. 625, n. 1-3, p. 234-46, 2009.

HENRIQUE, M. C.; NUNOMURA, S. M.; POHLIT, A. M. Alcaloides indólicos de cascas de *Aspidosperma vargasii* e *A. desmanthum*. **Química Nova**, v. 33, n. 2, p. 284-287, 2010.

HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. **The Lancet**, v. 354, n. 9185, p. 1191-1199, 1999.

HUBINGER, S. Z.; SALGADO, H. R. N.; MOREIRA, R. R. D. Controles físico, físico-químico, químico e microbiológico dos frutos de *Dimorphandra mollis* Benth., Fabaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, n. 3, p. 690-696, 2009.

HUGHES, N. A.; RAPOPORT, H. Flavopereirine, an alkaloid from *Geissospermum vellosii*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 80, n. 7, p. 1604-1609, 1958.

HWANG, Y. P.; YUN, H. J.; KIM, H. G.; HAN, E. H.; CHOI, J. H.; CHUNG, Y. C.; JEONG, H. G. Suppression of phorbol-12-myristate-13-acetate-induced tumor cell invasion by piperine via the inhibition of PKC α /ERK1/2-dependent matrix metalloproteinase-9 expression. **Toxicology Letters**, v. 203, n. 1, p.9-19, 2011.

ISHIYAMA, H.; MATSUMOTO, M.; SEKIGUCHI, M.; SHIGEMORI, H.; OHSAKI, A.; KOBAYASHI, J. Two new indole alkaloids from *Aspidosperma subincanum* and *Geissospermum vellosii*. **Heterocycles**, v. 66, n. 1, p. 651-658, 2005.

JÁCOME, R. L. R. P.; SOUZA, R. A.; OLIVEIRA, A. B. Comparação cromatográfica entre o extrato de *Aspidosperma parvifolium* e o fitoterápico "Pau-Pereira". **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, supl. 1, p. 39-41, 2003.

JÁCOME, R. L. R. P.; DE OLIVEIRA, A. B.; RASLAN, D. S.; WAGNER, H. Estudo químico e perfil cromatográfico das cascas de *Aspidosperma parvifolium* A. DC. ("PAU-PEREIRA"). **Química Nova**, v. 27, n. 6, p. 897-900, 2004.

JOLY, A. B. **Introdução à taxonomia vegetal**. 12. ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1998. p. 560-566.

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

JURAYI, J.; HAUGWITZ, R. D.; VARMA, R. K.; PAULL, K. D.; BARRETT, J. F.; CUSHMAN, M. Design and synthesis ellipticinium salts and 1,2-dihydroellipticines with high selectivities against human CNS cancers *in vitro*. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 37, n. 14, p. 2190–2197, 1994.

KILLICK-KENDRICK, R.; MOLYNEUX, D. H.; ASHFORD, R. W. Ultrastructural observations on the attachment of *Leishmania* in the sandfly. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene**, v.68, n.4, p.269-276, 1974.

KOCH, I.; RAPINI, A.; KINOSHITA, L. S.; SIMÕES, A. O.; SPINA, A. P. **Apocynaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB48>>. Acesso em: 31 Jan. 2016.

KUO, Y. C.; KUO, P. L.; HSU, Y. L.; CHO, C. Y.; LIN, C. C. Ellipticine induces apoptosis through p53-dependent pathway in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. **Life Sciences**, v. 78, n. 22, p. 2550-2557, 2006.

LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. **Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian; 2001. 500 p.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: PETERS, W.; KILLICK-KENDRICK, R. (Eds.). **The leishmaniasis in biology and medicine**, v.1. London: Academic Press, 1987. p. 1-120.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. A brief history of genus *Leishmania* (Protozoa: Kinetoplastida) in the Americas with particular reference to Amazonian. **Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science**, v. 44, n. 2-3, p. 94-106, 1992.

LEE, K. H. Anticancer drug design based on plant-derived natural products. **Journal of Biomedical Science**, v. 6, n. 4, p. 236-250, 1999.

LESCA, P.; RAFIDINARIVO, E.; LECOINTE, P.; MANSUY, D. A class of strong inhibitors of microsomal monooxygenases: the ellipticines. **Chemico-Biological interactions**, v. 24, n. 2, p. 189-197, 1979.

LEVINE, N. D.; CORLISS, J. O.; COX, F. E.; DEROUX, G.; GRAIN, J.; HONIGBERG, B. M. A newly revised classification of the Protozoa. **Journal of Protozoology**, v. 27, n. 1, p. 37-58, 1980.

LIMA, J. A.; COSTA, R. S.; EPIFÂNIO, R. A.; CASTRO, N. G.; ROCHA, M. S.; PINTO, A. C. *Geissospermum vellosii* stem bark: anticholinesterase activity and improvement of scopolamine-induced memory deficits. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 92, n. 3, p. 508-513, 2009.

LINDOSO, J. A. L.; COSTA, J. M. L.; QUEIROZ, I. T.; GOTO, H. Review of the current treatments for leishmaniasis. **Research and Reports in Tropical Medicine**, v. 3, p. 69-77, 2012.

LIST, P. H.; SCHMIDT, P. C. **Phytopharmaceutical technology**. Florida: CRC Press, 2000. 374 p.

LONGHINI, R.; RAKSA, S. M.; OLIVEIRA, A. C. P.; SVIDZINSKI, T. I. E.; FRANCO, S. L. Obtenção de extratos de própolis sob diferentes condições e avaliação de sua atividade antifúngica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 3, p. 388-395, 2007.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil**. São Paulo: Plantarum, 1992. 24 p.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil**. 2. ed. Novas Odessa: Editora Plantarum, 1998. 384 p.

MAHIDOL, C.; RUCHIRAWAT, S.; PRAWAT, H.; PISUTJAROENPONG, S.; ENGPRASERT, S.; CHUMSRI, P.; ENGPRASERT, S.; CHUMSRI, P.; TENGCHASRI, T.; SIRISINHA, S.; PICHA, P. Biodiversity and natural product drug discovery. **Pure and Applied Chemistry**, v. 70, n. 11, p. 2065-2072, 1998.

MAHIOU, V.; ROBLOT, F.; HOCQUEMILLER, R.; CAVÉ, A.; DE ARIAS, A. R.; INCHAUSTI, A.; YALUFF, G.; FOURNET, A.; ANGELO, A. New aporphine alkaloids from *Guatteria foliosa*. **Journal of Natural Products**, 57, n. 7, p. 890-895, 1994.

MANSKE, R. H. F.; HARRISSON, W. A. The alkaloids of *Geissospermum* species. **The Alkaloids: Chemistry and Physiology**, v.8, p.679-691, 1965.

MARCUCCI, M. C. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. **Química Nova**, v. 19, n. 5, p. 530-536, 1996.

MARION, L. The Indole Alkaloids. **The alkaloids: chemistry and physiology**, v. 2, p. 369-498. 1952.

MARSDEN, P. D. Pentavalent antimonials: old drugs for new diseases. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 18, n. 3, p. 187-198, 1985.

MARTINS, S. S. O. **Efeito dos alcaloides de *Geissospermum urceolatum* A. H. Gentry (Acariquara-Branca) na pressão arterial e a contração do músculo liso de ratos**. 2010. 94 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Amazonas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Manaus, 2010.

MAWE, J. **Viagens no interior do Brasil**. [1. ed. 1812]. Belo Horizonte: Itatiaia. São Paulo: EDUSP, 1978.

MBEUNKUI, F.; GRACE, M. H.; LATEGAN, C.; SMITH, P. J.; RASKIN, I.; LILA, M. A. *In vitro* antiplasmodial activity of indole alkaloids from the stem bark of *Geissospermum vellosii*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, n. 2, p. 471-477, 2012.

MBEUNKUI, F.; GRACE, M. H.; LILA, M. A. Isolation and structural elucidation of indole alkaloids from *Geissospermum vellosii* by mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 885-886, p. 83-89, 2012.

MELLO, J. C. P.; PETROVICK, P. R. Quality control of *Baccharis trimera* (Less.) DC. (Asteraceae) Hydroalcoholic extracts. **Acta farmacéutica bonaerense**, v. 19, n. 3, p. 211-215, 2000.

MILLIKEN, W. Traditional antimalarial medicine in Roaramia, Brazil. **Economic Botany**, v. 51, n. 3, p. 212-237, 1997.

MISSOURI BOTANICAL GARDEN. **Apocynaceae**. Disponível em: <<http://www.tropicos.org/Name/42000278>>. Acesso em: 30 set. 2015.

MISRA, P.; KUMAR, A.; KHARE, P.; GUPTA, S.; KUMAR, N.; DUBE, A. Pro-apoptotic effect of the landrace Bangla Mahoba of *Piper betle* on *Leishmania donovani* may be due to the high content of eugenol. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, p. 1058-1066, 2009.

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

MOORE, R. E.; RAPOPORT, H. Geissovelline, a new alkaloid from *Geissospermum vellosii*. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 38, n. 2, p. 215-230, 1973.

MORAIS, S. L.; BRAZ-FILHO, R. (Orgs.). **Produtos Naturais: estudos químicos e biológicos**. Fortaleza: EdUECE, 2007. 240 p.

MORAIS, J. A. **Estudo das ações cardiovasculares da fração alcaloídica obtida da espécie nativa amazônica *Geissospermum argenteum* Woodson**. 2012. 95 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Amazonas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Manaus, 2012.

MORAIS, R. C. S. **Aplicabilidade da técnica de PCR em tempo real para caracterização de espécies de *Leishmania***. 2015. 62 f. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) - Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Recife, 2015.

MOREIRA, J. Existe na Bahia o botão de Biskra?: estudo clínico. In: **Gazeta Medica da Bahia**, v.26, p. 254-258, 1895.

MORTON, J. F. **Atlas of medicinal plants of Middle America: Bahamas to Yucatan**. Springfield (Illinois): Charles C. Thomas, 1981. 1420 p.

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

MOTA, E. F.; ROSARIO, D. M.; VEIGA, A. S. S.; BRASIL, D. S. B.; SILVEIRA, F. T.; DOLABELA, M. F. Biological activities of *Croton palanostigma* Klotzsch. **Pharmacognosy**, v. 11, n. 43, p. 601-606, 2015.

MUÑOZ, V.; SAUVAIN, M.; BOURDY, G.; CALLAPA, J.; BERGERON, S.; ROJAS, I.; BRAVO, J. A.; BALDERRAMA, L.; ORTIZ, B.; GIMENEZ, A.; DEHARO, E. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. Part I. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by the Chacobo Indians. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 69, n. 2, p.127-137, 2000.

NAVARRO, F. F. ***Cissus gongylodes*: caracterização farmacognóstica e investigação de aspectos preliminares da seguridade da utilização de extratos aquosos das folhas e caules**. 2009. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, 2009.

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

NGURE, P. K.; TONUI, W. K.; INGONGA, J.; MUTAI, C.; KIGONDU, E.; NG'ANG'A, Z.; RUKUNGA, G.; KIMUTAI, A. *In vitro* antileishmanial activity of extracts of *Warburgia ugandensis* (Canellaceae), a Kenyan medicinal plant. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 3, n. 2, p. 61-66, 2009.

NONAKA, M.; YAMASHITA, K.; IIZUKA, Y.; NAMIKI, M.; SUGANO, M. Effects of dietary sesaminol and sesamin on eicosanoid production and immunoglobulin level in rats given ethanol. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 61, n. 5, p. 836-839, 1997.

NOVA, N. S. V. **Alternativas fitoterápicas para o tratamento da leishmaniose**. 2012. 147 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinária) – Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Fortaleza, 2012.

OLIVEIRA, F. M. M. **Vegetaes tonicos**. Rio de Janeiro: Typographia da Revista do Exército Brasileiro, 1883. 142 p.

OLIVEIRA, F. Q.; JUNQUEIRA, R. G.; STEHMANN, J.; BRANDÃO, M. G. L. 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, I. J. C. Atividade biológica e alcaloides indólicos do gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae): uma revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 1, p. 92-99, 2009.

OLLIARO, P. L.; BRYCESON, A. D. M. Practical progress and new drugs for changing patterns of leishmaniasis. **Parasitology Today**, v. 9, n. 9, p. 323-328, 1993.

OSORIO, D. E. J.; MONTOYA, P. G. L.; ARANGO, A. G. J. Productos naturales alcaloidales con actividad antiprotozoaria. **Vitae**, v. 13, n.1, p. 61-84, 2006.

OSTROSKY-ZEICHMER, L.; MARR, K. A.; REX, J. H.; COHEN, S. H. Amphotericin B: time for a new "gold standard". **Clinical Infectious Diseases**, v. 37, n. 3, p. 415-425, 2003.

PACCIONI, J-P.; HUSSON, H-P. Alcaloides de *Geissospermum argenteum* (Apocynaceae). **Phytochemistry**, v. 17, n. 12, p. 2146-2147, 1978.

PARAGUASSU-CHAVES, C. A. **Geografia Médica ou da Saúde: espaço e doença na Amazônia Ocidental**. Rondônia: EDUFRO: 2001. 280 p.

PECKOLT, G. As dez arvores genuinamente brasileiras mais uteis na medicina. **Revista da Flora Medicinal**, v. 9, n. 9, p. 453-470, 1942.

PELLISSARI, D. M.; CECHINEL, M. P.; SOUSA-GOMES, M. L.; LIMA Jr, F. E. F. Tratamento da Leishmaniose Visceral e Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 20, n. 1, p. 107-110, 2011.

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

PIMENTA, P. F. P.; MODI, G. B.; PEREIRA, S. T.; SHAHABUDDIN, M.; SACKS, D. L. A novel role for the peritrophic matrix in protecting *Leishmania* from the hydrolytic activities of the sandfly midgut. **Parasitology**, v. 115, n. 4, p. 359-369, 1997.

PIO CORRÊA, M. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Brasília: Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal. 1984. 687 p.

POLJAKOVÁ, J.; FREI, E.; GOMEZ, J. E.; AIMOVÁ, D.; ECKSCHLAGER, T.; HRABETA, J.; STIBOROVÁ, M. DNA adduct formation by the anticancer drug ellipticine in human leukemia HL-60 and CCRF-CEM cells. **Cancer Letters**, v. 252, n. 2, p. 270-279, 2007.

POMMIER, Y. Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. **Nature Reviews Cancer**, v. 6, n. 10, p. 789-802, 2006.

QUEIROZ, E. F.; ROBLLOT, F.; CAVE, A. Pesseine and spinosine, two catecholic berberines from *Annona spinescens*. **Journal of Natural Products**, v. 59, n. 4, p. 438-440, 1996.

RAMAMOORTHY, R.; DONELSON, J. E.; PAETZ, K. E.; MAYBODI, M.; ROBERTS, S. C.; WILSON, M. E. Three distinct RNAs for the surface protease gp63 are differentially expressed during development of *Leishmania donovani chagasi* promastigotes to an infectious form. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 3, p. 1888-1895, 1992.

RAPINI, A. Apocynaceae dogbane or milkweed Family. In: SMITH, N. et al. (Eds). **Flowering plants of the neotropics**. Oxford: Princeton University Press, 2004. p. 23-26.

RAPOPORT, H.; ONAK, T. P.; HUGHES, N. A.; REINECKE, M. G. Alkaloids of *Geissospermum vellosii*. **Journal of the American Society**, v. 80, n. 7, p. 1601-1604, 1958.

RAPOPORT, H.; MOORE, R. E. Alkaloids of *Geissospermum vellosii*. Isolation and structures determinations of vellosimine, vellosiminol and geissolosimine. **The Journal of Organic Chemistry**, v.27, n. 9, p. 2981-2985, 1962.

RASO, P.; GENARO, O. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: Brasileiro Filho, G et al. **Bogliolo Patologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994.

RATH, S.; TRIVELIN, L. A.; IMBRUNITO, T. R.; TOMAZELA, D. M.; DE JESÚS, M. N.; MARZAL, P. C.; ANDRADE Jr.; H. F.; TEMPONE, A. G. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: Estado de arte. **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 550-555, 2003.

REIMÃO, J. Q. **Estudo da atividade anti-leishmania de compostos de invertebrados marinhos brasileiros**. 2009. 132 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Secretaria do Estado de São Paulo, Programa de Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças, São Paulo, 2009.

REINA, M.; RUIZ-MESIA, W.; LÓPEZ-RODRÍGUEZ, M.; RUIZ-MESIA, L.; GONZÁLEZ-COLOMA, A.; MARTÍNEZ-DIAZ, R. Indole alkaloids from *Geissospermum reticulatum*. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 5, p. 928-934, 2012.

RIBEIRO, V. M. L.; COSTA, E. L.; BARROSO, M. A. L. Catálogo de Nomes Científicos e Vulgares de Plantas de Porte Arbóreo Ocorrentes no Brasil. In: Rodriguésia: **Revista do Jardim Botânico**, Rio de Janeiro, 1979. p. 155-233.

RIBEIRO, R. B. S.; GAMA, J. R. V.; MARTINS, S. V.; MORAES, A.; DOS SANTOS, C. A. A.; DE CARVALHO, A. N. Estrutura florestal em projeto de assentamento, comunidade São Mateus, município de Placas, Pará, Brasil. **Revista Ceres**, v. 60, n. 5, p. 610-620, 2013.

RIGO, R. S.; RIGO, L.; HONER, M. R. Alteração na função renal e pancreatite: efeitos adversos do tratamento da leishmaniose visceral. **Revista Arquivo de Ciências da Saúde**, v. 5, n. 3, p. 139-41, 2008.

RIOS, J. L.; RECIO, M.C.; VILLAR, A. Antimicrobial activity of selected plants employed in the Spanish Mediterranean area. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 21, n. 2, p. 139-152, 1987.

ROCHA, I. C. M. **Avaliação da atividade anti-leishmania *in vitro* de complexos Sbv-ribonucleosídeos em *Leishmania (Leishmania) chagasi***. 2009. 120 f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.

RODRIGUES, G. A.; SOUZA, W. C.; GODINHO, M. G. C.; FERREIRA, H. D.; VILA VERDE, G. M. Determinação de parâmetros farmacognósticos para as folhas de *Erythroxylum suberosum* A. St.-Hilaire (Erythroxylaceae) coletadas no município de Goiânia, GO. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.17, n.4, supl. III, p.1169-1176, 2015.

ROSS, R. Further Notes on Leishmania's bodies. **British Medical Journal**, v. 2, n. 2239, p. 1401, 1903.

ROSS, W. E.; GLAUBIGER, D. L.; KOHN, K. W. Protein-associated DNA breaks in cells treated with adriamycin or ellipticine. **Biochim Biophys Acta**, v. 519, n. 1, p. 23-30, 1978.

SACKS, D. L.; PERKINS, P. V. Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. **Science**, v. 223, n. 4643, p. 1417-1419, 1984.

SACKS, D. L. The structure and function of the surface lipophosphoglycan on different developmental stages of *Leishmania* promastigotes. **Infectious Agents and Disease**, v. 1, n. 4, p. 200-206, 1992.

SAHA, A. K.; MUKHERJEE, T.; BHADURI, A. Mechanism of action of amphotericin B on *Leishmania donovani* promastigotes. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 19, n. 3, p. 195-200, 1986.

SAITO, M. L.; FAZOLIN, M.; MAIA, A. H. N.; HORIUCHI, E. Y. O. **Avaliação de atividades biológicas em plantas de região amazônica para controle de insetos**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 2006. 18 p.

SANTOS, A. C. B.; SILVA, M. A. P.; SANTOS, M. A. F.; LEITE, T. R. Levantamento etnobotânico, químico e farmacológico de espécies de Apocynaceae Juss. ocorrentes no Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.15, n. 3, p. 442-458, 2013.

SANTOS, C. C.; VOLPATO, R. S. **Toxicidade aguda oral e atividade antimalárica in vivo do extrato etanólico das cascas de *Geissospermum vellosii* Allemão (Apocynaceae)**. 2015. 54 f. Monografia (Graduação em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Pará, Instituto Ciências da Saúde, Belém, 2015.

SARAIVA, R. M. C. **Atividade antibacteriana de plantas medicinais frente à bactérias multirresistentes e a sua interação com drogas antimicrobianas**. 2012. 94 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Pará, Instituto Ciências da Saúde, Belém, 2012.

SAUVAIN, M.; KUNESCH, N.; POISSON, J.; GANTIER, J-C.; GAYRAL, P.; DEDET, J-P. Isolation of leishmanicidal triterpenes and lignans from Amazonian liana *Dolioscarpus dentatus* (Deliaceae). **Phytotherapy Research**, v. 10, p.1-4, 1996.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; ATHAYDE, M. L. Saponinas. In: SIMÕES, C.M. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3 ed. Porto Alegre: UFRGS/UFSC, 2001. p. 597-619.

SECUNDINO, N. F. C.; EGER-MANGRICH, I.; BRAGA, E. M.; SANTORO, M. M.; PIMENTA, P. F. P. *Lutzomyia longipalpis* peritrophic matrix: formation, structure, and chemical composition. **Journal of Medical Entomology**, v. 42, n. 6, p. 928-938, 2005.

SHI, L. M.; FAN, Y.; MYERS, T. G.; O'CONNOR, P. M.; PAULL, K. D.; FRIEND, S. H.; WEINSTEIN, J. N. Mining the NCI anticancer drug discovery databases: genetic function approximation for the QSAR study of anticancer ellipticine analogues. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences**, v. 38, n. 2, p. 189-199, 1998.

SHIMADA, Y.; GOTO, H.; ITOH, T.; SAKAKIBARA, I.; KUBO, M.; SASAKI, H.; TERASAWA, K. Evaluation of the protective effects of alkaloids isolated from the hooks and stems of *Uncaria sinensis* on glutamate-induced neuronal death in cultured

cerebellar granule cells from rats. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 51, n. 6, p. 715-722, 1999.

SILVA, W. A. S.; CARIM, M. J. V.; GUIMARÃES, J. R. S.; TOSTES, L. C. L. Composição e diversidade florística em um trecho de floresta de terra firme no sudoeste do Estado do Amapá, Amazônia Oriental, Brasil. **Biota Amazônia (Biote Amazonie, Biota Amazonia, Amazonian Biota)**, v. 4, n. 3, p. 31-36, 2014.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2. ed., Porto Alegre/Florianópolis: Universidade/UFRGS/UFSC, 2000. 821p.

SINGH, S.; SIVAKUMAR, R. Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. **Journal Infection and Chemotherapy**, v. 10, n. 6, p. 307-315, 2004.

SKRABA, C. M.; PEDROSO, R. B.; FIORINI, A.; ROSADO, F. R.; ARISTIDES, S. M. A.; LONARDONI, M. V. C.; TEIXEIRA, J. J. V.; SILVEIRA, T. G. V. Diagnosis of American cutaneous leishmaniasis by enzyme immunoassay using membrane antigens of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 78, n. 4, p. 411-417, 2014.

SOARES, L. A. L.; ORTEGA, G. G.; BASSANI, V. L.; PETROVICK, P. R. Desenvolvimento tecnológico de soluções extrativas aquosas de *Phyllanthus niruri* L. (quebra-pedra) empregando planejamento fatorial. **Caderno de Farmácia**, v. 14, n. 1/2, p. 21-26, 1998.

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

SOUZA, O. V. S.; OLIVEIRA, M. S.; RABELLO, S. V.; CUNHA, R. O.; COSTA, B. L. S.; LEITE, M. N. Estudo farmacognóstico de galhos de *Vanillosmopsis erythropappa* Schult. Bip. – Asteraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, supl. 1, p. 50-53, 2003.

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

STALCUP, M. M. **Plantas de uso medicinal ou ritual numa feira livre no Rio de Janeiro, Brasil**. 2000. 202 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Botânica) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Museu Nacional, Fórum de Ciência e Cultura, Rio de Janeiro, 2000.

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

STRAYER, L. **Bioquímica**. 4. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. 1000 p.

SUN, H. X.; XIE, Y.; YE, Y. P. Advances in saponin-based adjuvants. **Vaccine**, v. 27, n. 12, p.1787-1796, 2009.

TANAE, M. M., SOUCCAR, C., LAPA, A. J., LIMA-LANDMAN, M. T. R. Molecular interaction of *Geissospermum's* alkaloids with $\alpha 7$ or muscle - type nicotinic receptors (nAChR) subtypes and with acetylcholinesterase (AChE). **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 27, p.347-347, 2006.

TEMPONE, A. G.; PEREZ, D.; RATH, S.; VILARINHO, A. L.; MORTARA, R. A.; DE ANDRADE Jr, H. F. Targeting *Leishmania (L.) chagasi* amastigotes through macrophage scavenger receptors: the use of drugs entrapped in liposomes containing phosphatidylserine. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 54, n. 1, p. 60-68, 2004.

THE ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 141, n. 4, p. 399-436, 2003.

TPL – The Plant List. Version 1.1. ***Geissospermum vellosii* Allemão**. Disponível em: <<http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/kew-88961>>. Acessado em: 02 ago. 2016.

TRACY, J. B.; WEBSTER JUNIOR, L. T. Drugs used in the chemotherapy of protozoal infections: Trypasonomiasis, Leishmaniasis, Amebiasis, Giardiasis, Trichomoniasis and other protozoal infection. In: HARDMAN, J. G.; GILMAN, A. G.; LIMBIRD, L. E. (Eds). **Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 9. ed. McGrawHill Companies, 1996. p. 987-1008.

TROPILAB[®]INC. ***Geissospermum vellosii / sericeum - Pao pereira***. 2007. Disponível em: <<http://www.tropilab.com/bergibita.html>>. Acesso em: 30 set. 2015.

URBINA, J. A. Lipid biosynthesis pathways as chemotherapeutic targets in kinetoplastid parasites. **Parasitology**, v. 114, p. 91-99, 1997.

URDAPILLETA, A. A. A. **Atividade de substâncias isoladas de líquens sobre formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazosensis* e *Leishmania (V.) braziliensis***. 2006. 87 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade de Brasília, Programa de Pós-Graduação Multiinstitucional em Ciências da Saúde, Brasília-DF, 2006.

VALE, V. V.; VILHENA, T. C.; TRINDADE, R. C. S.; FERREIRA, M. R. C.; PERCÁRIO, S.; SOARES, L. F.; PEREIRA, W. L. A.; BRANDÃO, G. C.; OLIVEIRA, A. B.; DOLABELA, M. F.; VASCONCELOS, F. Anti-malarial activity and toxicity assessment of *Himatanthus articulatus*, a plant used to treat malaria in the Brazilian Amazon. **Malaria Journal**, v. 14, n. 132, p. 1-10, 2015.

VALENTE, F. D. W. **Simulação de Exploração Madeireira na Reserva Extrativista Aquariquara, Machadinho D'Oeste – RO**. 2006. 27 f. Monografia (Graduação em Engenharia Florestal) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Florestas, Seropédica, 2006.

VAN ZANDBERGEN, G.; KLINGER, M.; MUELLER, A.; DANNENBERG, S.; GEBERT, A.; SOLBACH, W.; LASKAY, T. Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. **Journal of Immunology**, v. 173, n. 11, p. 6521-6525, 2004.

VEIGA, J. B.; SCUDELLER, V. V. Etnobotânica e medicina popular no tratamento de malária e males associados na comunidade ribeirinha Julião – baixo Rio Negro (Amazônia Central). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 4, suppl. 1, p. 737-747, 2015.

VIGNERON, M.; DEPARIS, X.; DEHARO, E.; BOURDY, G. Antimalarial remedies in French Guiana: a knowledge attitudes and practices study. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 26, n. 98, p. 351-360, 2005.

WAGNER, H.; BLADT, S.; ZGAINSKI, E. M. **Plant drug analysis**. Berlin: Springer-Verlag, 1984. 320 p.

WALTERS, L. L. *Leishmania* differentiation in natural and unnatural sand fly host. **Journal of Eukaryot Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 196-206, 1993.

WCSP. 2016. World Checklist of Selected Plant Families. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew. Published on the Internet. ***Geissospermum vellosii***. Disponível em: <<http://www.kew.org/search/google/geissospermum%20vellosii/>>. Acesso: 08 set. 2016.

WERNER, J. A. T.; OLIVEIRA, S. M.; MARTINS, D. F.; MAZZARDO, L.; DIAS, J. F. G.; LORDELLO, A. L. L.; MIGUEL, O. G.; ROYES, L. F.; FERREIRA, F.; SANTOS, A. R. S. Evidence for a role of 5-HT_{1A} receptor on antinociceptive action from *Geissospermum vellosii*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 125, n. 1, p. 163–169, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Quality control methods for medicinal plants materials**. Geneva: WHO, 1992.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases**. Geneva: WHO, 2010. P. 22–26.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Leishmaniasis - Situation and trends**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>>. Acesso em: 29 out. 2015.

YU, J.; CHEN, Q. The plant extract of Pao pereira potentiates carboplatin effects against ovarian cancer. **Pharmaceutical Biology**, v. 52, n. 1, p. 36-43, 2014.