

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) PI0905584-3 A2



(51) Int.CI.:
A61K 36/24 2006.01
A61P 33/06 2006.01

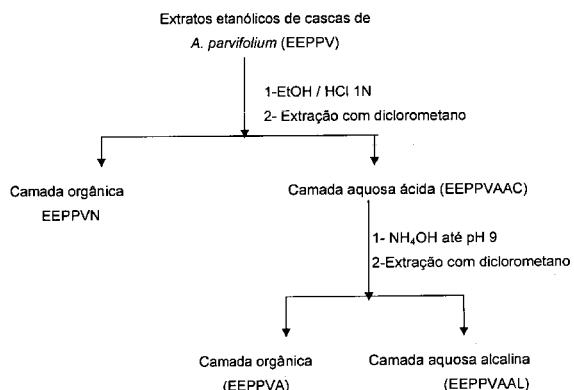
(22) Data de Depósito: 23/12/2009
(43) Data da Publicação: 23/08/2011
(RPI 2120)

(54) Título: EXTRATO E FRAÇÃO PADRONIZADOS DE CASCAS DE ASPIDOSPERMA PARVIFOLIUM E/OU ULEÍNA E SUA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA

(73) Titular(es): Universidade Federal de Minas Gerais

(72) Inventor(es): Alaíde Braga de Oliveira, Fabiana Maria Andrade Gomes, Fabíola Dutra Rocha, Maria Fani Dolabela, Rosa Maria Taveira Neiva, Rose Lisieux Ribeiro Paiva Jácome

(57) Resumo: EXTRATO E FRAÇÃO PADRONIZADOS DE CASCAS DE ASPIDOSPERMA PAR VIFOLIUM E SUA COMPOSIÇÃO FARMACEUTICA A presente invenção descreve o processo para obtenção de extrato e fração padronizados de Aspidosperma paivifolium, popularmente denominada "pau-pereira, guatambu ou peroba", além do isolamento e purificação da uleine. A invenção compreende, ainda, a obtenção de composições farmacêuticas que contêm o extrato, fração derivada e/ou uleine, bem como sua utilização para o tratamento da malária. O extrato, fração e uleine apresentados foram ensaiados e mostraram atividade antiplasmódica, particularmente contra Plasmodium falciparum.





PI0905584-3

**“EXTRATO E FRAÇÃO PADRONIZADOS DE CASCAS DE
ASPIDOSPERMA PARVIFOLIUM E/OU ULEÍNA E SUA COMPOSIÇÃO
FARMACÊUTICA”**

CAMPO DA INVENÇÃO

5 A presente invenção descreve o processo para obtenção de extrato e fração padronizados de *Aspidosperma parvifolium*, popularmente denominada “pau-pereira, guatambu ou peroba”, além do isolamento e purificação da uleína. A invenção compreende, ainda, a obtenção de composições farmacêuticas que contêm o extrato, fração derivada e/ou uleína e seus derivados, bem como sua
10 utilização para o tratamento da malária.

O extrato, fração e uleína apresentados foram ensaiados e mostraram atividade antiplasmódica, particularmente contra *Plasmodium falciparum*.

ESTADO DA TÉCNICA

A quimioterapia da malária teve início no século XVII. Os jesuítas que
15 vieram para a América do Sul observaram que os índios do Peru utilizavam plantas do gênero *Cinchona* spp (família Rubiaceae), conhecidas popularmente por quinas, para o tratamento de doenças febris. Estudos fitoquímicos de *Cinchona* spp, realizados na Europa, levaram ao isolamento na França, por Pelletier e Caventou, no início do século XIX, da quinina, que apresentou
20 atividade antimarialária. A quinina constituiu um modelo para a síntese dos antimarialários como mefloquina e cloroquina.

A cloroquina foi utilizada por um longo período no tratamento da malária, mais recentemente houve a introdução de novos fármacos como a artemisinina e a atovacona.

25 A artemisinina é uma substância ativa da *Artemisia annua*, de uso milenar na China, tendo sido isolada em 1972. Derivados semi-sintéticos como artemeter, arteeter e artesunato de sódio também se encontram em uso clínico (ROSENTHAL, P.J. e GOLDSMITH, R.S. Antiprozoários. Farmacologia Básica & clínica. Editor: Katzung, B.G.C. Guanabara- Koogan, 8^a ed, capítulo: 53, p.
30 769-783, 2003.)

A atovacona é uma naftoquinona sintética, um análogo do lapachol, que é freqüente em espécies de *Tabebuia*, gênero ao qual pertencem os ipês, árvores que ocorrem na América do Sul (MIRAGLIA, M.C.M. Estudo químico de *Tabebuia serratifolia* (Vahl.) Nichols (Bignoniaceae) e síntese de 5 piranonaftoquinonas, furanonaftoquinonas e antraquinonas. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Minas Gerais, 1991).

Neste contexto, as plantas têm dado importante contribuição para a quimioterapia da malária, como a quinina e a artemisinina.

A atividade antiplasmódica de alcalóides tem sido amplamente relatada 10 na literatura, sendo que, no período de 1990 a 2000, mais de uma centena de substâncias ativas desta classe foram descritas, algumas mais potentes que a cloroquina, conforme revisão recente. (SAXENA S, PANT N, JAIN DC, BHAKUNI RS. Antimalarial agents from plant sources. Current Sci, v. 85, p.1314-1329, 2003).

Muitas vezes estes alcalóides foram isolados de plantas 15 tradicionalmente utilizadas para o tratamento da malária, em diferentes regiões do mundo. Um levantamento da literatura indicou que 1200 espécies vegetais são empregadas nos três continentes para o tratamento da malária (WILLCOX, M.L. e BODEKER, G. Traditional herbal medicines for malaria. BMJ, Nov 2004; 20 329: 1156 – 1159).

O gênero *Aspidosperma* pertence à família Apocynaceae que inclui cerca de 200 gêneros e 2000 espécies. Espécies deste gênero ocorrem em 25 regiões tropical e subtropical, desde o México até a Argentina, encontrando-se em diferentes habitats, como nos cerrados da região centro sul do Brasil, áreas inundadas nas margens de rios da Amazônia, Paraguai, Argentina, México e regiões em elevação do Perú e Bolívia (WOODSON, R.S. Studies in the Apocynaceae VIII. An interim revision of the genus *Aspidosperma* Mart & Zucc. Ann. Missouri Botanical Garden. v.38, p.119, 1951).

De espécies do gênero *Aspidosperma* já foram isolados cerca de 250 30 alcalóides indólicos (JÁCOME, R.L.R.P. Estudo químico de *Zeyheria montana* M. e *Aspidosperma parvifolium* A.DC. Quantificação, por CLAE de

naftoquinonas isoladas de *Z. montana*. Tese UFMG/ICEx/DQ. Belo Horizonte, 1998, 157p).

Em relação ao uso tradicional e à atividade farmacológica de espécies deste gênero muito pouco se encontra registrado na literatura. Levantamento 5 etnofarmacológico realizado no município de Igarapé Mirim (PA, Brasil) revelou que a população local utiliza cascas de *Aspidosperma*, entre as quais, *A. auriculatum*, para o tratamento de malária e febre. (BARBOSA, W.L.R.; TAVARES, J.C.C. e SOARES, D.C. Alcalóides de *Aspidosperma auriculatum* Standl. Rev. Bras. Farmacogn. 13 (supl), p.06-08, 2003).

10 De modo geral, na Amazônia, algumas espécies de *Aspidosperma* são utilizadas pelas populações indígenas e caboclas, para vários fins medicinais, como o tratamento de inflamações do útero e ovário, diabetes, câncer, como contraceptivo e tratamento da malária. (MILLIKEN, W. Plants for malaria for fever: medicinal species in Latin America-a bibliography survey. Kew: the Royal 15 Botanic Gardens. Monografia. The Royal Botanic Gardens, 27, 1997). As espécies mais utilizadas são *A. nitidum*, *A. marcgravianum*, *A. carapanauba* e *A. desmantun* .(BRANDÃO, M., GRANDI, T., ROCHA, E., SAWYER, D., KRETTLI, A. Survey of medicinal plants used as antimalarials in the Amazon. Journal of Ethnopharmacology, v.36, p.175–182, 1992).

20 A espécie *A. quebracho-blanco* é usada como febrífugo, para o tratamento de asma, bronquite, enfisema e febre. (BOWN, D. Encyclopedia of herbs & their uses. Dorling, Kindersley, London, 1995). *A. excelsum* é indicada para problemas estomáquicos e indigestão (CHEVALIER, A. The encyclopedia of medicinal plants. Dorling Kindersley. London, 1996).

25 Foram isolados de *A. pyrifolium* e *A. megalocarpon* onze alcalóides com esqueleto aspidospermano e avaliada sua atividade antiplasmódica (cepas sensível e resistente a cloroquina) e citotoxicidade. Destes alcalóides, sete são tetracíclicos, apresentando grupo etila livre, e mostraram Cl_{50} entre 3,2 e 15,4 μM , após 72h de exposição. Entretanto, quatro alcalóides pentacíclicos 30 mostraram reduzida atividade antiplasmódica, isto é, Cl_{50} entre 22,6 e 52,6 μM Avaliou-se, também, a associação alcalóide e cloroquina, tendo observado sinergismo nas seguintes associações: cloroquina - N-formil-aspidospermidina

e cloroquina- aspidospermina . Em relação à citotoxicidade (células NiH 3T3), os alcalóides com alta atividade antiplasmódica apresentaram menor citotoxicidade. (MITAINE-OFFER, A.C.; SAUVAIN, M.; VALENTIN, A.; CALLAPA, J.; MALLIE, M. e ZECHES-HANROT, M.. Antiplasmodial activity of 5 *Aspidosperma* indole alkaloids. *Phytomedicine*, v.9(2), p.142-145, 2002).

Aspidosperma *parvifolium* é conhecida, popularmente, como guatambú, peroba ou pau-pereira. Em termos botânicos, esta espécie se caracteriza por possuir folhas glabras, membranáceas, de coloração prateada na parte inferior, de 5-10 cm de comprimento. A árvore possui 10-15 m de altura, com o tronco 10 de 40-60 cm de diâmetro. Produz, anualmente, grande quantidade de sementes que são amplamente disseminadas pelo vento. Floresce no final do mês de agosto com surgimento da nova folhagem. O desenvolvimento da planta no campo é rápido, podendo atingir 3,5-4,0 m aos 2 anos (LORENZI, H. Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas 15 Nativas do Brasil. Nova Odessa, SP: Editora Plantarum,1992).

Do extrato etanólico de cascas de *A. parvifolium* foram isolados os alcalóides N-metiltetraidroelipticina (BURNELL, R.H. e CASA, D.D. Alkaloids of *Aspidosperma vargasii* A.DC. *Can J Chem.*, v.45, p.89, 1967), uleína, epiuleína, aparcina, desmetiluleína, além de um triterpeno, o lupeol, e um esteróide, o 20 estigmasterol (JÁCOME, R.L.R; OLIVEIRA, A.B.; RASLAN, D.S. e WAGNER, H. Estudo químico e perfil cromatográfico das cascas de *Aspidosperma parvifolium* A. DC. ("Pau-Pereira"). *Química Nova*, v.27 (6), p.897-900, 2004)

A uleína já foi obtida de outras espécies de *Aspidosperma*, como *A. olivaceum* e *A. tomentosum*. (GILBERT, B.; DUARTE, A.P.; NAKAWAY, Y.; JOULE, J.A.; FLORES, S.E.; BRISSOLE, J.A.; CAMPELO, J.; CARRAZZONI, E.P.; OWELLEN, R.J.; BROSEY, E.C.; BROWN Jr.; K.S. e DJERASSI, C. 25 Alkaloids studies L-The alkaloids of twelve *Aspidosperma* species *Tetrahedron*, v.21, p.1141-1161, 1965).

O extrato etanólico de cascas de *A. parvifolium* avaliado quanto à letalidade em *Artemia salina* e inibição de calos, induzidos por *Agrobacterium tumefaciens*, em discos de batatas, demonstrou um elevado potencial antitumoral, isto é, a concentração letal 50% (CL_{50}) foi 103,8 g/ml para a 30

5 *Artemia salina* e, nesta concentração, houve inibição de 94,4% da formação dos calos em discos de batata. Este extrato apresentou, também, atividade anti-*Trypanosoma cruzi*. (DOLABELA, M.F. Triagem *in vitro* para atividade antitumoral e anti-*Trypanossoma cruzi* de extratos vegetais, produtos naturais e substâncias sintéticas. Belo Horizonte: Depto de Fisiologia e Farmacologia, ICB, UFMG, 1997. 130p. Dissertação de Mestrado). A toxicidade observada em *Artemia salina*, provavelmente está relacionada à presença de alcalóides indólicos.

10 Uma mistura de alcalóides indólicos, contendo predominantemente a uleína (53%) reduziu a secreção ácida no estômago de roedores, e esta redução pode estar relacionada ao bloqueio da bomba H+, K+-ATPase. (BAGGIO, C.H.; MARTINI OTOFUJI, G.; SOUZA, W.M.; MORAES SANTOS, C.A.; TORRES, L.M.; RIECK, L.; ANDRADE MARQUES, M.C. e MESIA-VELA, S. Gastroprotective mechanisms of indole alkaloids from *Himatanthus lancifolius*. *Planta Med*, v.71(8), p.733-8, 2005).

15 Outro alcalóide indólico, presente em *A. parvifolium*, a aparicina, foi submetido ao ensaio para atividade antifúngica, porém não foi observada inibição do crescimento do microorganismo. (HERNANDEZ, N.M.R. e PEREZ, C.D. Fungal activity of various alkaloids isolated from *Catharanthus roseus* G. 20 Don. *Rev Cubana Med Trop*, v.29(3), p.147-52, 1977).

Atualmente, encontramos disponíveis algumas patentes relacionadas a presente invenção:

O pedido de patente BE814772-A descreve a obtenção de novos alcalóides terapêuticos através da extração das cascas de *Aspidosperma spegazzinii*. A casca foi extraída com benzeno ou clorofórmio, o extrato resultante é lavado com solução ácida. A solução de lavagem é tratada com solução alcalina para precipitação dos alcalóides totais, que são separados posteriormente por cromatografia em alumina.

30 A patente FR2865652 relata a utilização de extratos de plantas ou ingredientes ativos isolados a partir destes, na preparação de composições farmacêuticas, de cosméticos e nutracêuticos, como agentes lipolíticos e anticelulites. Os extratos são selecionados a partir de plantas do gênero:

Aspidosperma; Catharanthus; Eschscholzia; Bocconia; Vismia; Orbignya; Terminalia; Entada; Hypericum; Ginkgo; Viburnum; Papaver e Butea.

A patente US3225053 relata o isolamento de quebranchidina e derivados a partir do extrato de *Aspidosperma quebracho-blanco* e sua utilização como psicosedativos e bloqueadores β adrenérgicos.

PROBLEMAS DO ESTADO DA TÉCNICA

Os fármacos disponíveis para o tratamento da malária nem sempre apresentam resultados satisfatórios. A cloroquina, por apresentar baixa toxicidade e ser economicamente viável, foi amplamente utilizada no tratamento da malária, durante muitos anos, porém, devido à crescente resistência dos parasitos, novos fármacos tiveram que ser introduzidos, como a artemisinina e a atovacona.

Porém, a atovacona, bem como a artemisinina e derivados são de custo elevado o que inviabiliza o seu uso em regiões endêmicas pobres, além da possibilidade de desenvolvimento de resistência dos parasitos a estes fármacos, o que já se observou para a artemisinina. Há, portanto, necessidade de novos agentes antimaláricos que sejam eficazes contra cepas do *P. falciparum* resistentes a cloroquina, promovendo a cura em tempo razoável para garantir adesão ao tratamento, sejam seguros e de baixo custo (FIDOCK, D.A.; ROSENTHAL, P.J.; CROFT, S.L.; BRUN, S. e NWAKA, S. Antimalarial drug discovery: efficacy models for compound screening. Nat Rev Drug Discov, Jun 2004; 3(6): 509-20).

VANTAGENS DA TECNOLOGIA

Embora existam no mercado composições farmacêuticas para o tratamento de malária, bem como seus processos de obtenção, nenhuma destas propõe um processo de obtenção e composições farmacêuticas de extrato padronizado de casas de *A. parvifolium*, fração rica em alcalóides e uleína com atividade antiplasmódica.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

Figura 1: Extração ácido-base a partir do extrato etanólico de cascas de *A. parvifolium*

Figura 2: Cromatograma da fração EEPPVA

5 Figura 3: Cromatograma de uleína

Figura 4: Cromatograma de EEPPVA + uleína

Figura 5: Espectro no IV de APT 13-16 (8) (uleína)

Figura 6: Espectro de massa por impacto eletrônico de APT 13-16 (8) (uleína)

DESCRIÇÃO DETALHADA DA TECNOLOGIA

10 A presente invenção descreve o processo para obtenção de extrato e fração padronizados de *Aspidosperma parvifolium*, popularmente denominada “pau-pereira, guatambu ou peroba”, além do isolamento e purificação da uleína. A invenção compreende, ainda, a obtenção de composições farmacêuticas que contêm o extrato, fração derivada e/ou uleína, bem como sua utilização para o
15 tratamento da malária.

A composição da presente invenção caracteriza-se pelo uso do extrato, fração ou uleína, combinados com excipientes farmaceuticamente aceitáveis. Exemplos de excipientes incluem água, solução salina, soluções tamponadas com fosfato, solução de Ringer, solução de dextrose, solução de Hank,
20 soluções salinas biocompatíveis contendo ou não polietilenoglicol. Veículos não aquosos, como óleos fixos, óleo de sésamo, oleato de etila, ou triglicerídeo também podem ser utilizados. Podem ser preparadas composições com um exciente ou mistura desses.

Os excipientes também podem conter quantidades menores de aditivos
25 como substâncias que aumentam a isotonicidade e estabilidade química de substâncias ou tampões. Exemplos de tampões incluem tampão fosfato, tampão bicarbonato e tampão Tris, enquanto exemplos de conservantes incluem timerosal, m- ou o-cresol, formalina e álcool benzílico. As composições

padrões podem ser líquidas ou sólidas. Desta forma, numa formulação sólida, o excipiente pode incluir dextrose, conservantes, para qual água ou solução salina estéril podem ser acrescentadas antes da administração. Além de aglutinantes, desintegrantes, diluentes, lubrificantes, tensoativos.

5 Essas composições podem ser administradas via intramuscular, intravenosa, subcutânea, oral, inalatória ou como dispositivos que possam ser implantados ou injetados, sendo preferencialmente administrados por via oral.

A presente invenção pode ser mais bem entendida através dos seguintes exemplos, não limitantes de tecnologia:

10 **Exemplo 1: Obtenção do extrato e fração padronizados de cascas de *Aspidosperma parvifolium***

As cascas pulverizadas de *A. parvifolium* foram submetidas à extração por percolação exaustiva, com etanol a 96°GL. Na seqüência, o extrato etanólico foi concentrado em evaporador rotatório, a 50 °C, sob pressão reduzida, até resíduo, sendo mantido em dessecador até peso constante.

O extrato etanólico de cascas de *A. parvifolium* (EEPPV) (10,0 g) foi solubilizado em reduzido volume de etanol (<10ml) e HCL aquoso a 1N (250 ml) seguindo-se de extração com diclorometano (3 x 250 ml) ou éter dietílico, ou diclorometano ou acetato de etila, obtendo-se uma camada de diclorometano (EEPPVN) e uma camada aquosa ácida (EEPPVAAC). A esta adicionou-se NH₄OH até pH 9 e extraiu-se com diclorometano (3 x 250 ml), obtendo-se uma camada aquosa alcalina (EEPPVAAL) e uma camada orgânica (fração alcaloídica) (EEPPVA). O fluxograma destas extrações encontra-se na Figura 1.

25 Nas condições controladas, a fração rica em alcalóides (EEPPVA) foi padronizada para conter 45 a 60% m/m de uleína e também apresentou como constituintes epiuleína, desmetileléina e aparicina, segundo a impressão digital padronizada por cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (Figura 2).

Exemplo 2: Isolamento e identificação da uleína

O extrato etanólico de *A. parvifolium* (EEPPV) foi submetido à extração ácido-base sendo obtida a fração alcaloídica (EEPPVA), desta fração, após cromatografias sucessivas em coluna de Sephadex LH-20 e sílica gel, 5 obtiveram-se as frações, APT 13-16 (7) e APT 13-16 (8) que apresentaram uma mancha única em CCDS (reveladores: anisaldeído-ácido sulfúrico e reagente de Dragendorff). As frações obtidas foram comparadas com amostra de uleína isolada por Jácome (1998), apresentando muita similaridade. (JÁCOME, R.L.R.P. Estudo químico de *Zeyheria montana* M. e *Aspidosperma parvifolium* A.DC. Quantificação, por CLAE de naftoquinonas isoladas de *Z. montana*. Tese UFMG/ICEEx/DQ. Belo Horizonte, 1998, 157p.)

Os cromatogramas por CLAE-FR acoplado a um detector UV confirmaram tratar-se da uleína, sendo observados picos com TR 25,820 min para a uleína de referência (Figura 3) e 25, 556 min para a uleína presente no 15 EEPPVA (Figura 2). A identificação do pico correspondente à uleína no cromatograma do EEPPVA foi confirmada por co-injeção com uleína de referência (Figura 4) e pelos espectros no UV registrados online que apresentam um máximo de absorção em 304,2 nm.

O espectro no IV de APT 13-16 (8) (Figura 5) apresentou absorções 20 correspondentes a deformação axial de ligações C-H (3176 cm^{-1}), estiramento N-H (3040 cm^{-1}), estiramento da ligação C=C em sistema aromático (1535 e 1613 cm^{-1}) e deformação de ligações C-H em anel benzênico orto-dissubstituído, sendo esta a mais intensa do espectro (730 cm^{-1}). Este espectro mostrou muita semelhança com o da uleína (JÁCOME, R.L.R.P. Estudo 25 químico de *Zeyheria montana* M. e *Aspidosperma parvifolium* A.DC. Quantificação, por CLAE de naftoquinonas isoladas de *Z. montana*. Tese UFMG/ICEEx/DQ. Belo Horizonte, 1998, 157p.), como era esperado.

O espectro de massa de APT 13-16 (8) apresentou o íon molecular esperado, em m/z 266, correspondendo à uleína (Figura 6).

Exemplo 3: Avaliação da atividade antiplasmódica

A atividade antiplasmódica do extrato etanólico de cascas de *A. parvifolium* (EEPPV), fração alcaloídica (EEPPVA) e uleína [APT 13-16 (8)] foi testada pelo método tradicional (RIECKMAN, K.H.; SAX, L.J.; CAMPBELL, 5 G.H.; MRENA, J.F. Drug sensitivity of *Plasmodium falciparum*. An *in vitro* microtechnique. *Lancet*, v.i, p.22-23, 1978./ CARVALHO, L.H. *Quimioterapia experimental com extratos brutos de plantas e compostos quimicamente definidos*).

A avaliação através do método tradicional apresentou os seguintes 10 resultados: no clone W2 (resistente à cloroquina), o extrato etanólico de *A. parvifolium* (EEPPV) apresentou $Cl_{50} 32,75 \pm 1,06 \mu\text{g/ml}$. A fração de alcalóides (EEPPVA) e a uleína mostraram-se ativas ($Cl_{50} < 10 \mu\text{g/ml}$). No clone 15 3d7(sensível à mefloquina), o extrato etanólico (EEPPV) apresentou atividade antiplasmódica moderada, já a fração alcaloídica (EEPPVA) e a uleína foram ativas ($Cl_{50} < 10 \mu\text{g/ml}$) (Tabela 1)

Tabela 1: Atividade antiplasmódica, *in vitro*, pelo método tradicional, do extrato etanólico de cascas de *A. parvifolium* (EEPPV), fração de alcalóides (EEPPVA) e uleína

	W2(resistente à cloroquina)		3d7(sensível à mefloquina)	
	$Cl_{50}(\mu\text{g/ml}) \pm$ DP	$Cl_{90}(\mu\text{g/ml}) \pm$ DP	$Cl_{50}(\mu\text{g/ml}) \pm$ DP	$Cl_{90}(\mu\text{g/ml}) \pm$ DP
Cloroquina	$0,02 \pm 0,002$	ND	$0,0013 \pm 0,0001$	$0,0020 \pm 0,0001$
Mefloquina	$0,0165 \pm 0,002$	$0,0895 \pm 0,002$	$0,048 \pm 0,0007$	$0,0975 \pm 0,007$
EEPPV	$32,75 \pm 1,06$	$74,50 \pm 1,34$	$20,51 \pm 0,70$	$38,00 \pm 4,26$
EEPPVA	$1,25 \pm 0,35$	$6,25 \pm 0,76$	$2,45 \pm 1,55$	$8,50 \pm 0,71$
Uleína	$0,75 \pm 0,10$	$1,91 \pm 0,10$	$11,90 \pm 0,10$	$23,25 \pm 2,50$

Exemplo 4: Avaliação da citotoxicidade *in vitro*

20 A avaliação da citotoxicidade *in vitro* foi realizada através do ensaio colorimétrico do MTT (TWENTYMAN, P.R., LUSCOMBE, M. A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity. British J. Cancer, v. 56, p. 279-285, 1987.)

- EEPPV mostrou-se pouco tóxico para células VERO ($CC_{50} > 500 \mu\text{g/ml}$), enquanto que a fração de alcalóides (EEPPVA) e a uleína mostraram uma citotoxicidade moderada ($100 < CC_{50} < 500 \mu\text{g/ml}$). Quando se determinou o índice de seletividade ($IS = CC_{50}/Cl_{50}$) utilizando-se as Cl_{50} obtidas para o clone 5 W2 (Tabela 1) observou-se que, quanto mais pura a amostra, maior seu índice de seletividade, isto é, a uleína apresentou IS mais alto do que o extrato(EEPPV) e a fração (EEPPVA). Porém quando se utilizam os resultados obtidos com o clone 3d7 (Tabela 1), as alterações nos IS são discretas e menos favoráveis (Tabela 2).
- 10 **Tabela 2:** Citotoxicidade (CC_{50}) e índice de seletividade (IS) de extrato etanólico de cascas de *Aspidosperma parvifolium* (EEPPV), fração de alcalóides (EEPPVA) e uleína.

	$CC_{50}(\text{mg/ml})$	IS (W2)	IS (3d7)
EEPPV	>500	>15,27	>24,38
EEPPVA	299,7	305,82	39,28
Uleína	374,6	499,47	31,47

Exemplo 5: Avaliação da toxicidade *in vivo*

- Os efeitos tóxicos do extrato alcoólico (EEPPV) e da fração rica em 15 alcolóides (EEPPVA) foram avaliados em camundongos após administração aguda (triagem observacional, avaliação da coordenação motora, atividade motora e toxicidade aguda) e em ratos após administração repetida de 28 dias (avaliação comportamental, hematologia, bioquímica sérica e anatomoatopatológica). Na triagem observacional, onde os extratos foram 20 administrados oralmente nas doses de 10, 100 e 1000 mg/kg, verificou-se maior toxicidade para a fração EEPPVA.

Os estudos toxicológicos realizados com o extrato EEPPV e a fração EEPPVA indicam certo grau de toxicidade destes extratos quando em doses elevadas, mas boa tolerabilidade em baixas doses, ou seja, até 250 mg/kg 25 (agudo) ou 150 mg/kg (crônico) no caso do EEPPV; ou 75 e 50 mg/kg (agudo e crônico, respectivamente) do EEPPVA.

REIVINDICAÇÕES

- 1- EXTRATO E FRAÇÃO PADRONIZADOS DE CASCAS DE **ASPIDOSPERMA PARVIFOLIUM**, caracterizado por compreender fração padronizada rica em alcalóides contendo uma faixa de 45 a 60% m/m de uleína, além dos constituintes epiuleína, desmetiluleína e aparcina;
- 2- EXTRATO E FRAÇÃO PADRONIZADOS DE CASCAS DE **ASPIDOSPERMA PARVIFOLIUM**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por compreender a padronização baseada na otimização dos processos de extração e fracionamento, bem como na atividade antiplasmódica determinada para o principal marcador químico da fração: uleína;
- 3- EXTRATO E FRAÇÃO PADRONIZADOS DE CASCAS DE **ASPIDOSPERMA PARVIFOLIUM** de acordo com as reivindicações 1 e 2, caracterizado pela referida fração padronizada enriquecida em alcalóides, e pelo perfil por CLAE característico apresentando, semelhante àquele selecionado da Fig. 3;
- 4- COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA DE EXTRATO E FRAÇÃO PADRONIZADOS DE CASCAS DE **ASPIDOSPERMA PARVIFOLIUM** E/ OU ULEÍNA E SEUS DERIVADOS, caracterizado por compreender fração padronizada rica em alcalóides contendo uma faixa de 45 a 60% m/m de uleína, além dos constituintes epiuleína, desmetiluleína e aparcina e pelo menos um excipiente farmacêutica e farmacologicamente aceitável;
- 5- COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA DE EXTRATO E FRAÇÃO PADRONIZADOS DE CASCAS DE **ASPIDOSPERMA PARVIFOLIUM** E/OU ULEINA E SEUS DERIVADOS de acordo com a reivindicação 4, caracterizada por apresentar atividade antiplasmódica;
- 6- COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA DE EXTRATO E FRAÇÃO PADRONIZADOS DE CASCAS DE **ASPIDOSPERMA PARVIFOLIUM** E/OU ULEINA E SEUS DERIVADOS de acordo com as reivindicações 4 e 5, caracterizada por ser administrada pelas vias oral, intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, subcutânea, transdérmica ou como dispositivos que possam ser implantados ou injetados; sendo preferencialmente administrada por via oral;

7- COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA DE EXTRATO E FRAÇÃO PADRONIZADOS DE CASCAS DE *ASPIDOSPERMA PARVIFOLIUM* E/OU ULEINA E SEUS DERIVADOS de acordo com as reivindicações 4 a 7, caracterizada por ser na preparação de medicamentos para tratar malária;

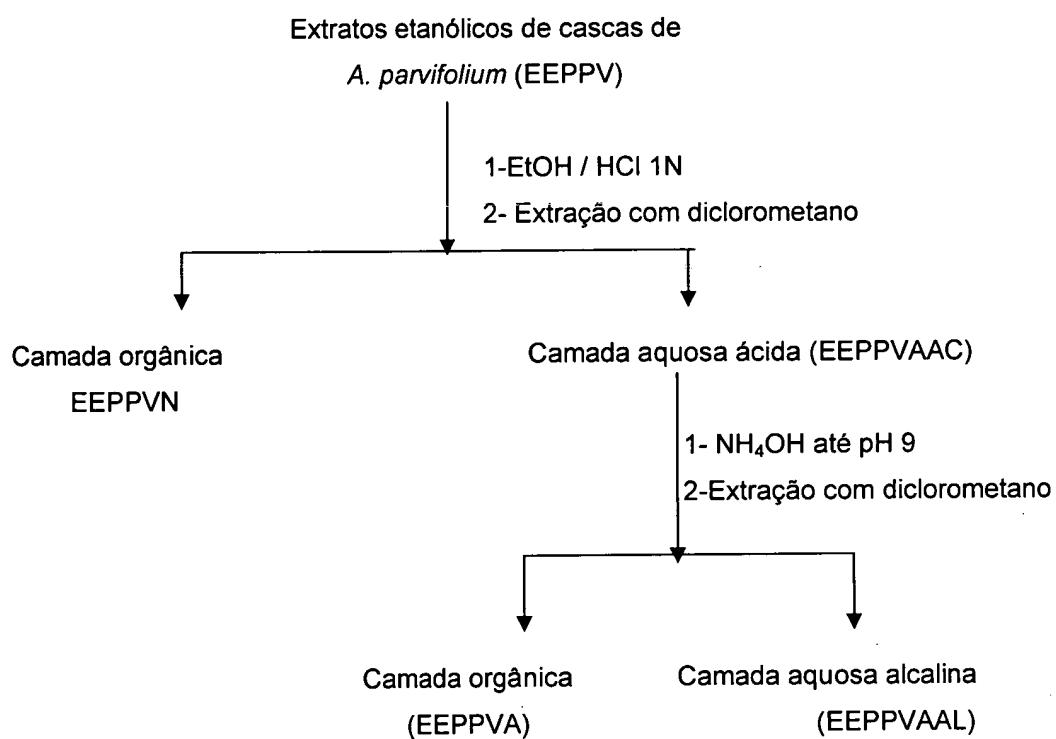
FIGURAS

Figura 1

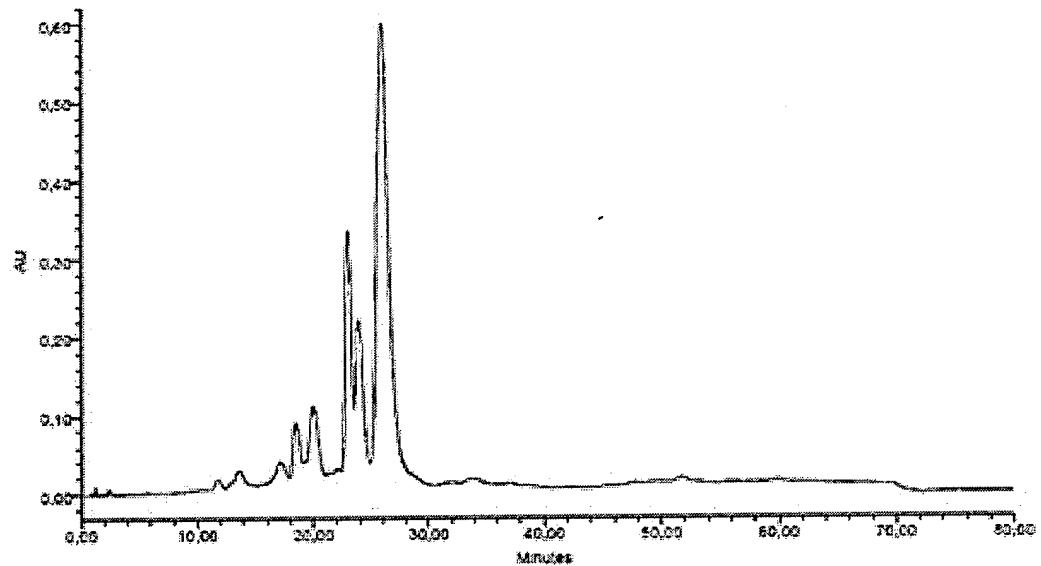


Figura 2

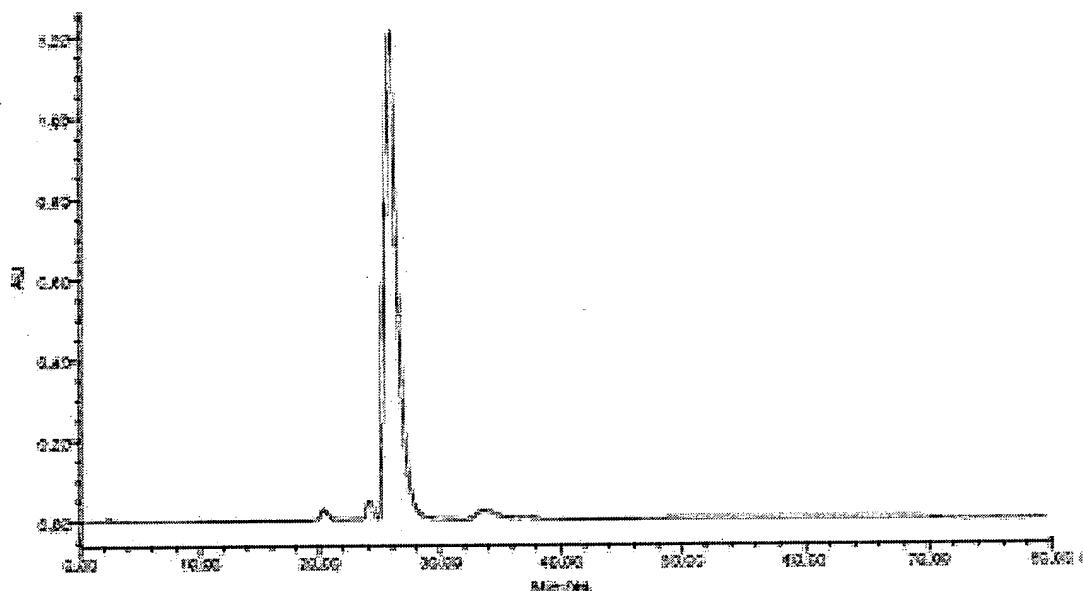


Figura 3

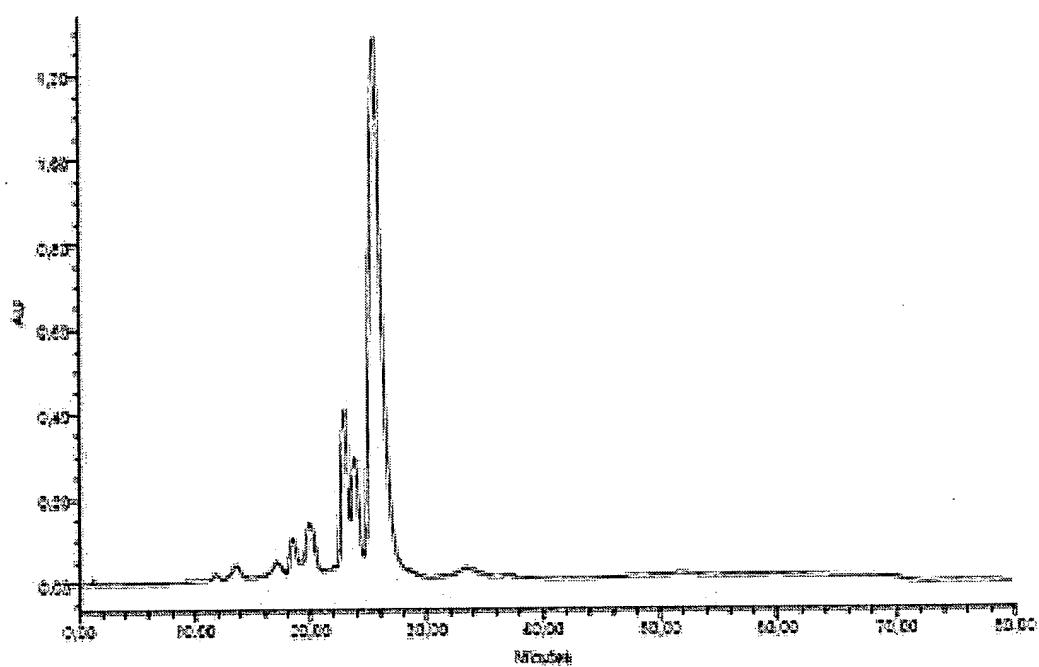


Figura 4

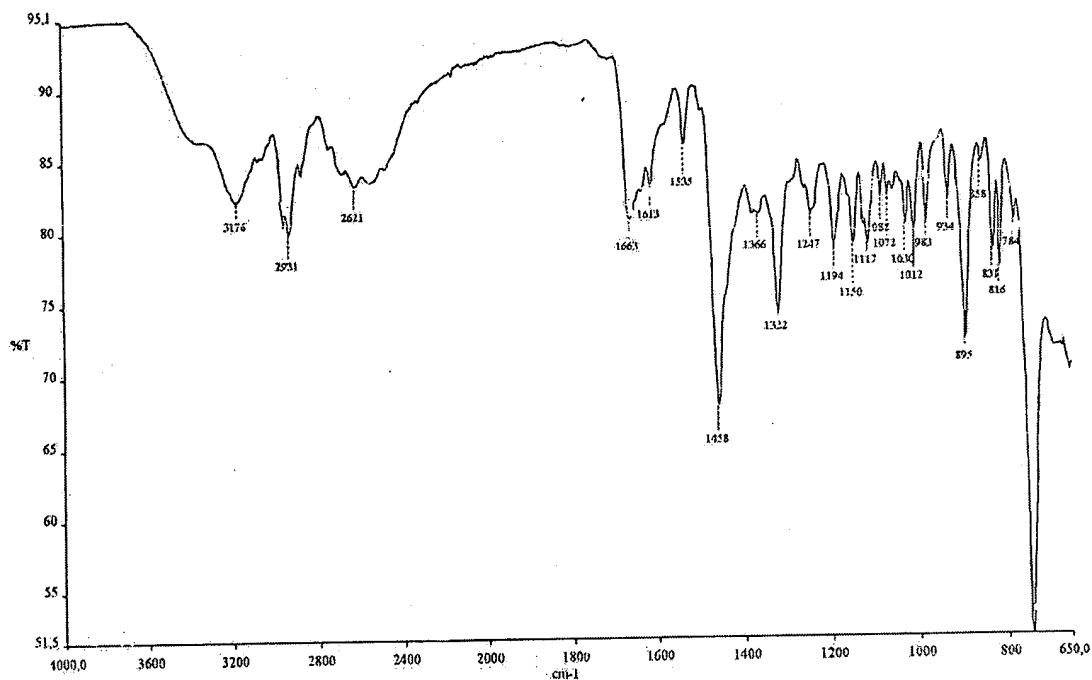


Figura 5

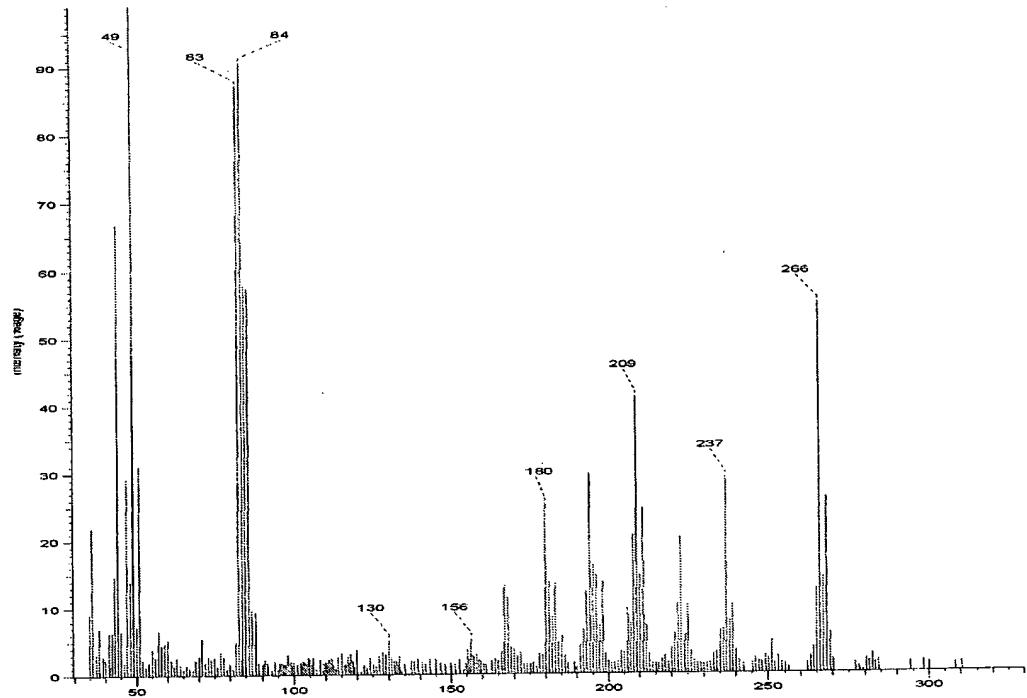


Figura 6

PT0905584-3

RESUMO

"EXTRATO E FRAÇÃO PADRONIZADOS DE CASCAS DE ASPIDOSPERMA PARVIFOLIUM E SUA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA"

A presente invenção descreve o processo para obtenção de extrato e fração padronizados de *Aspidosperma parvifolium*, popularmente denominada "pau-pereira, guatambu ou peroba", além do isolamento e purificação da uleína. A invenção compreende, ainda, a obtenção de composições farmacêuticas que contêm o extrato, fração derivada e/ou uleína, bem como sua utilização para o tratamento da malária.

O extrato, fração e uleína apresentados foram ensaiados e mostraram atividade antiplasmódica, particularmente contra *Plasmodium falciparum*.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA

Maria Fâni Dolabela

ATIVIDADE ANTIPLASMÓDICA E CITOTOXICIDADE DE *Esenbeckia febrifuga*
(A.St-Hil.) Juss. ex Mart. (RUTACEAE) E DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Aspidosperma*
(APOCYNACEAE).

Belo Horizonte
2007

Maria Fâni Dolabela

ATIVIDADE ANTIPLASMÓDICA E CITOTOXICIDADE DE *Esenbeckia febrifuga* (A.St-Hil.)
Juss. ex Mart. (RUTACEAE) E DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Aspidosperma* (APOCYNACEAE).

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Alaíde Braga de Oliveira,
Faculdade de Farmácia, UFMG, Belo Horizonte.
Co-Orientadora: Dra. Marinete Marins Póvoa, Instituto
Evandro Chagas, Ananindeua.

Belo Horizonte
2007

Dolabela, Maria Fâni.
D659a Atividade antiplasmódica e citotoxicidade de *Esenbeckia febrifuga* (A.St-Hil.) Juss. Ex Mart. (Rutaceae) e de espécies do gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae) / Maria Fani Dolabela. – 2008. 179 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Alaíde Braga de Oliveira, Faculdade de Farmácia, UFMG, Belo Horizonte
Co-Orientadora: Dra. Marinete Marins Póvoa, Instituto Evandro Chagas, Ananindeua
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Alcalóides – Teses. 2. *Aspidosperma* – Teses. 3. *Esenbeckia febrifuga* – Teses. 4. Atividade antiplasmódica – Teses. 5. Citotoxicidade – Teses. 6. Índice de seletividade – Teses. I. Título. II. Oliveira, Alaíde Braga de. III. Póvoa, Marinete Marins. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia.

CDD:615.321

COLABORADORES

1- FITOQUÍMICA

Prof. Dr. Fernão Castro Braga, Faculdade de Farmácia, UFMG

Profa. Dra. Rose L. P. Jácome, Faculdade de Farmácia, UFMG

2- CULTIVO DE *Plasmodium falciparum*

Ms. Salma de Oliveira Gomes, Departamento de Parasitologia, IEC

3- COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

Prof. Dr. Júlio A. Lombardi, UNESP, Rio Claro, SP.

A parte de fitoquímica foi realizada no Laboratório de Fitoquímica da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG. O cultivo do *P. falciparum* e a atividade antiplasmódica foram realizados no Laboratório de Malária da Seção de Parasitologia do Instituto Evandro Chagas, em Ananindeua, PA.

Este trabalho faz parte de projetos coordenados pela Profa. Dra. Alaíde Braga de Oliveira e financiado pelos: 1- Edital Universal CNPq nº. 019/2004 Processo nº.474642/2004-6; 2- CNPq- DPT- CGSAU Doenças negligenciadas; 3- Projeto apresentado ao CNPq no âmbito do Edital MCT/CNPq no. 14/2006 Programa Sul-Americano de Apoio às Atividades de Cooperação em Ciência e Tecnologia – PROSUL

A minha alma espera somente em Deus; Dele vem a minha salvação. Só Ele é a minha rocha e a minha salvação; é a minha defesa, não serei grandemente abalado.

Salmo 52: 1-2.

DEDICATÓRIAS

Dedico este trabalho a Deus, a minha filha e ao meu marido.

- Deus:

“ Eu exaltarei, ó Deus, rei meu, e bendirei o teu nome pelos séculos dos séculos.
Cada dia te bendirei, e louvarei o teu nome pelos séculos dos séculos.
Grande é o Senhor, e muito digno de louvor, e a sua grandeza inescrutável.”
Salmos 145: 1-3.

- Minha filha- *Luíza Dolabela Barneche* :

“ Ainda que eu falasse as línguas dos homens e dos anjos, e não tivesse amor, seria como um metal que soa ou como um sino que tine.
E ainda que tivesse o dom de profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e ainda que tivesse toda a fé de tal maneira que transportasse os montes, e não tivesse amor, nada seria.” I Aos Coríntios 13: 1-2

Meu marido- *Varli Luiz Barneche*:

”Quando encontrar alguém e esse alguém fizer
seu coração parar de funcionar por alguns segundos,
preste atenção: pode ser a pessoa
mais importante da sua vida.
Se os olhares se cruzarem e, neste momento,
houver o mesmo brilho intenso entre eles,
fique alerta: pode ser a pessoa que você está
esperando desde o dia em que nasceu.
Se o toque dos lábios for intenso, se o beijo
for apaixonante, e os olhos se encherem
d'água neste momento, perceba:
existe algo mágico entre vocês.
Se o 1º e o último pensamento do seu dia
for essa pessoa, se a vontade de ficar
juntos chegar a apertar o coração, agradeça:
Algo do céu te mandou
um presente divino : O AMOR.

Carlos Drumond de Andrade”

AGRADECIMENTOS

A Profa. Alaíde Braga de Oliveira pela orientação desta tese, onde sua boa disposição e colaboração foram fatores de estímulos para realização da parte experimental e escrita deste trabalho.

A Dra. Marinete M. Povoa, pela valiosa contribuição e por ter possibilitado a realização da parte experimental dos ensaios antiplasmódicos, através do fornecimento de laboratório e técnicos muito qualificados.

A Dra. Luzia Helena de Carvalho pelas valiosas contribuições para a realização da parte experimental deste trabalho.

A Profa. Rose L.P.Jácome, Prof. Fernão C. Braga, Ms. Salma G.Oliveira, José Maria N. Souza e José Mario V. Peres pelos valiosos ensinamentos e colaborações para realização da parte experimental.

Aos amigos do Instituto Evandro Chagas- Eduardo Mota, Joyce Favacho e Luiz Dikson e da Faculdade de Farmácia- UFMG pela boa convivência durante a realização deste trabalho.

Aos Coordenadores dos Cursos de Farmácia e Enfermagem do Centro Universitário do Pará (CESUPA) que sempre contribuíram me liberando ou remanejando minhas atividades acadêmicas para poder executar as atividades relacionadas a tese.

Aos colegas do CESUPA, Profa. Mônica Moraes , Profa. Lourdes Garcez e Prof. Davi J. Oliveira pela valiosa amizade, carinho e força nos momentos difíceis desta jornada.

RESUMO

Na busca de antimaláricos 6 espécies do gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae) foram objeto de estudo: *A. cylindrocarpon*, *A. olivaceum*, *A. parvifolium*, *A. ramiflorum*, *A. spruceanum* e *A. tomentosum*, além de *Esenbeckia febrifuga* (Rutaceae). Estas espécies são utilizadas, popularmente, para tratamentos de malária e febres, no Brasil e outros países da América do Sul. Os extratos em solventes orgânicos de diferentes partes destas espécies foram submetidos a prospecção por cromatografia em camada delgada de sílica gel (CCDS) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), a ensaios *in vitro* com os clones W2 e 3d7 do *Plasmodium falciparum* e a avaliação da citotoxicidade em culturas de células VERO. A prospecção por CCDS mostrou a presença de alcalóides em todas as espécies de *Aspidosperma* analisadas e os perfis dos diferentes extratos foram obtidos por CLAE- FR. Todos os extratos apresentaram atividade antiplasmódica, sendo determinadas as CI_{50} entre 0,98 a 65,0 $\mu\text{g/mL}$. O extrato etanólico de cascas [ETOH-P (Cs)] de *A. parvifolium* foi submetido à extração ácido-base sendo separadas as frações correspondentes a substâncias neutras (APN) e básicas/álcalóides totais (APT) que se mostraram mais ativas que o extrato etanólico original. Uleína foi isolada a partir do APT e apresentou CI_{50} $0,75 \pm 0,10$ e $11,90 \pm 0,10$ $\mu\text{g/mL}$ frente aos clones W2 e 3d7, respectivamente. A citotoxicidade (CC_{50}) de ETOH-P (Cs), APT, APN e uleína, em culturas de células VERO, foi baixa para ETOH-P (Cs) de *A. parvifolium* e citotoxicidade moderada para as frações e uleína ($100 < CC_{50} < 500 \mu\text{g/mL}$) e os índices de seletividade ($IS = CC_{50}/CI_{50}$) foram: A citotoxicidade (CC_{50}) e os índices de seletividades ($IS = CC_{50}/CI_{50}$) para a atividade antiplasmódica foram: ETOH-P (Cs): $CC_{50} > 500 \mu\text{g/mL}$, IS (W2) $> 15,27$ e IS (3d7) $> 24,38$; APT-1: $CC_{50} 299,7 \mu\text{g/mL}$, IS (W2) $> 305,82$ e IS (3d7) $= 39,28$; APN-1: $CC_{50} = 449,3 \mu\text{g/mL}$, IS (W2) $= 29,91$ e IS (3d7) $= 25,31$ e uleína: $CC_{50} = 374,6 \mu\text{g/mL}$, IS (W2) $= 500,0$ e IS (3d7) $= 31,47$. O extrato etanólico de caules [ETOH-P (Ca)] de *E. febrifuga* forneceu 8 substâncias: 2 cumarinas (bergapteno e isopimpinelina), 4 quinolonas (skimmiamina, kokusaginina, γ -fagarina e flindersiamina), 1 liminoide (rutaevina) e 1 acridona (1-hidroxi-3-metoxi-N-metilacridona). Nos ensaios de atividade antiplasmódica *in vitro*, ETOH-P (Ca) mostrou-se moderadamente ativo ($CI_{50} = 15,5 \pm 0,75 \mu\text{g/mL}$, W2; $21,0 \pm 1,41 \mu\text{g/mL}$, 3d7) e apresentou baixa citotoxicidade para células VERO ($CC_{50} > 500 \mu\text{g/mL}$). Das substâncias avaliadas a mais ativa foi a skimmiamina ($CI_{50} = 19,5 \pm 0,71 \mu\text{g/mL}$, W2; $43,0 \pm 1,41 \mu\text{g/mL}$, 3d7). Estes são os primeiros relatos sobre química de *E. febrifuga*, atividade antiplasmódica *in vitro* do extrato etanólico de caules e substâncias isoladas. São também, inéditos os resultados relatados sobre atividade antiplasmódica e citotoxicidade de diversos extratos orgânicos das 6 espécies de *Aspidosperma* avaliadas, bem como das frações resultantes do fracionamento de *A. parvifolium*.

Palavras-chave: 1- Alcalóides, 2-*Aspidosperma*; 3- *Esenbeckia febrifuga*; 4- Atividade antiplasmódica; 5- Citotoxicidade; 6-Índice de seletividade

ABSTRACT

Aiming to discover new antimalarial agents, extracts from six plant species belonging to the genus *Aspidosperma* (Apocynaceae), *A. cylindrocarpon*, *A. olivaceum*, *A. parvifolium*, *A. ramiflorum*, and *A. tomentosum*, besides *Esenbeckia febrifuga* (Rutaceae), were screened for antiplasmodial activity and cytotoxicity. Some of these species are traditionally used to treat malaria and or fever in Brazil and other Latinamerican countries. Extracts in organic solvents of different parts of these plants have had their chromatographic profiles registered by TLC and HPLC and were assayed *in vitro* against *Plasmodium falciparum* W2 and 3d7 clones as well on cultured VERO cells for cytotoxicity. Phytochemical prospection by TLC has indicated the presence of alkaloids in all of the six species, as expected for plants belonging to the genus *Aspidosperma*, and HPLC-RP profiles were registered in acidic conditions as suggested for alkaloid analysis. All the extracts assayed have shown antiplasmodial activity with IC₅₀ values ranging from 5.0 to 65.0 µg/mL. Acid-base separation of the ethanol extract from *A. parvifolium* stem bark [EtOH-P(Cs)] has afforded fractions of neutral (APN) and basic (total alkaloids, APT) compounds which, for the *Aspidosperma* species, were more active as antiplasmodial than the crude EtOH extracts. Uleine was isolated from APT by a combination of silica gel and Sephadex LH-20 open column chromatography and has shown IC₅₀ of 0.75 ± 0.10 and 11.90 ± 0.10 µg/mL against W2 and 3d7 clones of *P. falciparum*, respectively. Cytotoxicity (CC₅₀) for EtOH-P(Cs), APT, APN and ulleine ranged from low to moderate (100<CC₅₀>500 µg/mL). Selectivity index (SI = CC₅₀ Vero cells/IC₅₀ *P. falciparum*) was more favourable (>300) for APT, APN and ulleine than for the crude EtOH extract (<25). From the ethanol extract of *E. febrifuga* stems, 8 compounds were isolated: 2 coumarins (bergaptene and isopimpinelin), 4 quinolones (skimmiamine, kokusagenine, γ-fagarine and flindersiamine), 1 limonoid (rutaevine) and 1 acridone (1-hydroxy-3-methoxy-N-methylacridone). Skimmiamine was the most active of the alkaloids assayed (IC₅₀ = 19.5 ± 0.7 µg/mL, W2; 43.0 ± 1.4 µg/mL, 3d7). However it was less active than the crude extract (IC₅₀ = 15.5 ± 0.8 µg/mL, W2; 21.0 ± 1.4 µg/mL, 3d7) indicating the presence of non isolated active compounds in the extract. These are the first report on the chemical composition of *E. febrifuga*, the *in vitro* antiplasmodial activity of its stems EtOH extract and of pure compounds isolated from this Rutaceae plant species. The results on the antiplasmodial activity and cytotoxicity of the extracts from the six species of *Aspidosperma*, as well of APN, APT and ulleine from *A. parvifolium*, are reported by the first time in this thesis.

Key words: 1- Alkaloids, 2-*Aspidosperma*; 3- *Esenbeckia febrifuga*; 4- Antiplasmódial activity; 5- Citotoxicity; 6-Selectivity index

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

<i>P. vivax</i>	<i>Plasmodium vivax</i>
<i>P. falciparum</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
<i>A. cylindrocarpon</i>	<i>Aspidosperma cylindrocarpon</i>
<i>A. olivaceum</i>	<i>Aspidosperma olivaceum</i>
<i>A. parvifolium</i>	<i>Aspidosperma parvifolium</i>
<i>A. spruceanum</i>	<i>Aspidosperma spruceanum</i>
<i>A. tomentosum</i>	<i>Aspidosperma tomentosum</i>
rpm	Rotações por minuto
min	Minuto
CI ₅₀	Concentração inibitória 50%
CC ₅₀	Concentração citotóxica 50%
IS	Índice de seletividade
CIM	Concentração inibitória mínima
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
MEM	Meio Mínimo Essencial (Eagle-MEM)
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanolsulfônico
SFB	Soro fetal bovino
MTT	Sal de tetrazolio
APN1	Fração de neutros 1 de <i>A. parvifolium</i>
APA-1	Fração aquosa ácida 1 de <i>A. parvifolium</i>
API-1	Fração interface 1 de <i>A. parvifolium</i>
APAA	Fração aquosa alcalina de <i>A. parvifolium</i>
APT-1	Fração de alcalóides totais 1 de <i>A. parvifolium</i>
APTC	Fração de alcalóides totais cloroformica de <i>A. parvifolium</i>
APA-2	Fração aquosa ácida 2 de <i>A. parvifolium</i>
APT-2	Fração de alcalóides totais 2 de <i>A. parvifolium</i>
EFN	Fração de neutros de <i>E. febrífuga</i>
EFA	Fração aquosa ácida de <i>E. febrífuga</i>
EFAA	Fração aquosa alcalina de <i>E. febrífuga</i>
EFT	Fração de alcalóides totais de <i>E. febrífuga</i>
HCl	Ácido Clorídrico
NH ₄ OH	Hidróxido de amônio
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
NaCl	Cloreto de sódio
CO ₂	Dióxido de carbono
UV	Ultra-violeta
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
Rh+	Fator Rh+
³ H	Trítio
W2	Clone de <i>P. falciparum</i> resistente a cloroquina e sensível a mefloquina
3d7	Clone de <i>P. falciparum</i> sensível a cloroquina
Células VERO	Células de rins de macaco verde
RP-18	Fase reversa, C ₁₈

SUMÁRIO

Nº da página

Resumo	
Abstract	
Abreviaturas e símbolos	
Índice de Figuras	
Índice de Quadros	
Índice de Tabelas	
Estruturas químicas	
1- INTRODUÇÃO	22
2-OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA	30
2.1- Objetivo Geral	30
2.2.- Objetivos específicos	30
2.3- Justificativa	30
3-REVISÃO DA LITERATURA	33
3.1- O gênero <i>Aspidosperma</i> : posição taxonômica, alcalóides, etnofarmacologia e atividades biológicas	33
3.1.1- Posição taxonômica	33
3.1.2- Alcalóides indólicos	34
3.1.3- Etnofarmacologia	35
3.1.4- Revisão da literatura sobre as espécies de <i>Aspidosperma</i> avaliadas no presente trabalho: descrição botânica, atividades biológicas e alcalóides	42
3.1.4.1- <i>Aspidosperma parvifolium</i>	42
3.1.4.2- <i>Aspidosperma cylindrocarpon</i>	45
3.1.4.3- <i>Aspidosperma olivaceum</i>	46
3.1.4.4- <i>Aspidosperma ramiflorum</i>	49
3.1.4.5- <i>Aspidosperma spruceanum</i>	51
3.1.4.6- <i>Aspidosperma tomentosum</i>	53
3.2- <i>Esenbeckia febrífuga</i> : posição taxonômica, fitoquímica, etnofarmacologia e atividades biológicas	55
4- MATERIAL	63
4.1- Equipamentos	63
4.2 - Solventes e Reagentes	64
4.3- Reagentes para revelação e fases estacionárias para CCDS	65
4.4- Componentes do meio de cultura e de outras soluções utilizadas nos cultivos	65
4.5- Material plástico	65
4.6- Soluções especiais utilizadas neste trabalho	66
4.6.1- Soluções Reveladoras para CCDS	66
4.6.1.1- Reagente de Dragendorff	66
4.6.1.2- Anisaldeído/ ácido sulfúrico	66
4.6.1.3- Reagente de Liberman- Buchard	66
4.6.1.4- Solução de hidróxido de potássio a 5%	66
4.6.1.5- Solução de cloreto de alumínio	67
4.6.1.6- NP/PEG	67
4.6.2- Solução utilizada como fase móvel em CLAE	67
4.6.2.1- Tampão fosfato ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$)	67
4.6.3- Soluções utilizadas durante o cultivo do <i>P. falciparum</i>	67
4.5.6.1- Meio de cultivo: Meio RPMI 1640 (<i>Roswell Park Memorial Institute</i>) e meio completo	67

4.6.3.2- Soluções utilizadas no descongelamento do parasito	68
4.6.3.3- Solução utilizada na sincronização do parasito	68
4.7- Coloração de gota espessa e esfregação	68
4.7.1- Solução estoque de Giemsa	69
4.7.2- Água tamponada	69
4.7.3- Azul de metileno	69
4.8- Material biológico	69
4.8.1- Clones de <i>P. falciparum</i>	69
4.8.2- Plasma humano	69
4.8.3- Hemácias humanas	70
4.9- Material Vegetal	70
5- MÉTODOS	72
5.1- Preparação dos extratos e caracterização fitoquímica	72
5.1.1- Obtenção dos extratos	72
5.1.2- Extração ácido-base	72
5.2- Estudos fitoquímicos	74
5.2.1- Prospecção fitoquímica por cromatografia em camada delgada de sílica gel (CCDS)	74
5.2.2- Perfis por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	76
5.2.2.1- Preparo das amostras	76
5.2.2.2- Condições cromatográficas	76
5.2.2.2.1- Condição cromatográfica 1	76
5.2.2.2.2- Condição cromatográfica 2	76
5.2.2.2.3- Condição cromatográfica 3	77
5.2.2.2.4- Condição cromatográfica 4	77
5.2.2.3- Injeção das amostras	77
5.2.3- Análises em CLAE acoplado a detector com arranjos de diodos (DAD).	78
5.2.3.1- Condição cromatográfica	78
5.2.4- Fracionamento da fração de alcalóides totais (APT-1) obtida por extração ácido-base do extrato etanólico de <i>A. parvifolium</i>	78
5.2.4.1- Por coluna cromatográfica	78
5.3-Avaliação da atividade antiplasmódica	80
5.3.1- Descongelamento dos clones de <i>P. falciparum</i>	80
5.3.2- Cultivo do <i>P. falciparum</i>	81
5.3.3- Coloração de gota espessa e esfregaço e determinação da parasitemia	81
5.3.4- Sincronização dos parasitos	82
5.3.5- Congelamento dos clones <i>P. falciparum</i>	82
5.3.6- Preparo das placas de 96 poços utilizadas nos ensaios	83
5.3.7- Microteste utilizando [8 ³ H]-hipoxantina	85
5.3.8- Microteste tradicional	86
5.4- Avaliação da citotoxicidade (CC ₅₀)	86
5.4.1- Ensaio colorimétrico do MTT	87
5.4.2- Cálculo do índice de seletividade	88
5.5- Alguns parâmetros utilizados neste trabalho, para avaliar a atividade antiplasmódica, citotoxicidade e índice de seletividade	88
6- RESULTADOS	89
6.1- Obtenção de extratos, caracterização fitoquímica, atividade antiplasmódica e citotoxicidade das espécies de <i>Aspidosperma</i>	89
6.1.1- Obtenção dos extratos	89
6.2- Análise e caracterização dos extratos	90
6.2.1- Cromatografia em Camada Delgada de Sílica	90

6.2.2- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	91
63- Atividade antiplasmódica e citotoxicidade	92
6.4-Fracionamento do extrato etanólico da cascas de <i>A. parvifolium</i>	99
6.4.1- Descrição da obtenção do extrato etanólico das cascas, frações e caracterização por cromatografia em camada delgada e cromatografia de alta eficiência	99
6.4.2- Isolamento e identificação da uleína	104
6.4.3- Atividade antiplasmódica do extrato etanólico de cascas de <i>A. parvifolium</i> , frações e APT 13-16 (8) (uleína) pelos métodos tradicional (RIECKMAN <i>et al.</i> , 1978 modificado por CARVALHO, 1990) e radioisotópico (DESJARDINS <i>et al.</i> , 1979)	108
6.4.4- Citotoxicidade em células VERO, pelo método do MTT (TWENTNAN e LUSCOMBE, 1987) de extrato etanólico de cascas de <i>A. parvifolium</i> , frações e APT 13-16 (8) (uleína) e índice de seletividade (IS)	109
6.5- <i>Esenbeckia febrifuga</i> : fracionamento do extrato etanólico de caules, caracterização fitoquímica, atividade antiplasmódica, citotoxicidade e índices de seletividade	110
6.5.1- Fracionamento do extrato etanólico de caules de <i>E. febrifuga</i> .	110
6.5.2- Caracterização fitoquímica: análises em cromatografia em camada delgada de sílica gel e cromatografia líquida de alta eficiência do ETOH-P (Ca) de <i>E. febrifuga</i> , frações e substâncias	112
6.5.3- Atividade antiplasmódica, citotoxicidade e índice de seletividade de extrato etanólico de caules de <i>E. febrifuga</i> , frações e substâncias	114
7-DISCUSSÃO	117
7.1- Comparação dos resultados obtidos para atividade antiplasmódica da cloroquina e mefloquina com os dados da literatura	117
7.2- Relação entre os dados da literatura e os resultados obtidos para	118
7.2.1- <i>Aspidosperma cylindrocarpon</i>	118
7.2.2- <i>Aspidosperma olivaceum</i>	119
7.2.3- <i>Aspidosperma ramiflorum</i>	120
7.2.4- <i>Aspidosperma spruceanum</i>	121
7.2.5- <i>Aspidosperma tomentosum</i> .	122
7.3- <i>A. parvifolium</i> : análises fitoquímicas, atividades antiplasmódica, citotoxicidade e índices de seletividade	123
7.3.1- Estudos fitoquímicos	123
7.3.2- Atividade antiplasmódica, citotoxicidade e IS do ETOH-P (Cs) de <i>A. parvifolium</i> , frações e uleína	125
7.3.2.1- Correlação dos resultados obtidos nos estudos fitoquímicos a atividade antiplasmódica <i>in vitro</i>	125
7.3.2.2- Ensaio radioisotópico do extrato etanólico de cascas de <i>A. parvifolium</i> e frações	126
7.3.2.3- Citotoxicidade de extrato etanólico de cascas de <i>A. parvifolium</i> , frações e APT 13-16/ uleína (18)	128
7.4- Relação entre dados da literatura e os resultados obtidos para <i>Esenbeckia febrifuga</i> .	131
7.4.1- Estudos fitoquímicos e cromatográficos em CCDS e CLAE, atividade antiplasmódica e citotoxicidade	131
7.5- Análise da atividade antiplasmódica dos extratos, frações e substâncias	134
8- CONCLUSÕES	137
9-REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	138
10- ANEXOS	153

Anexo 1- Cromatogramas obtidos em análises em CLAE de extratos de espécies de <i>Aspidosperma</i> e uleiána	153
Anexo 2- Trabalho (aceito)	162
Anexo 3- Resumos apresentados em Congresso	177

ÍNDICE DE FIGURAS

	Nº da página
Figura 1: Ciclo de vida dos parasitos da malária humana	23
Figura 2: Distribuição de malária no mundo, perfil da resistência a cloroquina e a sulfadoxina.	24
Figura 3: Núcleo indólico e suas formas reduzida e oxidada	34
Figura 4: Alguns tipos de alcalóides indólicos isolados de espécies do gênero <i>Aspidosperma</i>	36
Figura 5: <i>Aspidosperma parvifolium</i> : árvore, inflorescência, frutos, sementes, casca e madeira	45
Figura 6: <i>Aspidosperma cylindrocarpon</i> : árvore, inflorescência, frutos, sementes, casca e madeira	47
Figura 7: <i>Aspidosperma ramiflorum</i> : árvore, inflorescência, frutos, sementes, casca e madeira	51
Figura 8: <i>Aspidosperma spruceanum</i> : árvore, inflorescência, frutos, sementes, casca e madeira	52
Figura 9: <i>Aspidosperma tomentosum</i> : árvore, inflorescência, frutos, sementes, casca e madeira	54
Figura 10: <i>Esenbeckia febrifuga</i> : árvore, inflorescência, frutos, sementes, casca e madeira	57
Figura 11: Fluxograma da extração ácido-base do extrato etanólico de cascas de <i>A. parvifolium</i>	73
Figura 12: Extração ácido-base a partir dos extratos etanólicos de cascas de <i>A. parvifolium</i> e <i>E. febrifuga</i>	74
Figura 13: Diferentes estágios do <i>P. falciparum</i>	83
Figura 14: Esquema da placa de 96 poços utilizada nos ensaios para a atividade antiplasmódica	84
Figura 15: Cromatografia em camada delgada de sílica do extrato etanólico de cascas <i>A. parvifolium</i> , frações e uleína	100
Figura 16: Cromatogramas de extrato etanólico de cascas de <i>A. parvifolium</i> , frações e uleína	101
Figura 17: Cromatogramas obtidos na análise em CLAE acoplado a detector com arranjos de diodos (DAD), do extrato etanólico de cascas de <i>A. parvifolium</i> (Apocynaceae), APT- 1 e APT13-16 (8)	103
Figura 18: Cromatogramas, obtidos por CLAE, de uleína, APT 13-16 (7) e APT 13-16 (8).	105
Figura 19: Espectro no IV de APT 13-16 (8)	106
Figura 20: Espectro no UV de APT 13-16 (8), obtido em CLAE acoplado a detector com arranjos de diodos (DAD)	107
Figura 21: Espectro de massa por impacto eletrônico de APT 13-16 (8)	107
Figura 22: Perfis cromatográficos, obtidos por CLAE, do extrato etanólico de caules de <i>E. febrifuga</i> e frações	113
Figura 23: Perfis cromatográficos, obtidos por CLAE, do extrato etanólico de caule-folhas de <i>A. cylindrocarpon</i>	153
Figura 24: Perfis cromatográficos, obtidos por CLAE, dos extratos de <i>A. olivaceum</i>	154
Figura 25: Perfis cromatográficos, obtidos por CLAE, dos extratos de <i>A. ramiflorum</i>	156
Figura 26: Perfis cromatográficos, obtidos por CLAE, dos extratos de <i>A.</i>	

spruceanum

158

Figura 27: Perfis cromatográficos, obtidos por CLAE, dos extractos de etanólicos de *A.tomentosum*.

160

ÍNDICE DE QUADROS

	Nº da página
Quadro 1: Estruturas químicas da quinina e quinolinas antimaláricas sintéticas	25
Quadro 2: Estruturas químicas de algumas drogas antimaláricas	27
Quadro 3: Estruturas químicas de alcalóides isolados de <i>A. marcgravianum</i> e <i>A. excelsum</i>	38
Quadro 4: Estruturas químicas da elipticina, elipticinium e aspidocarpina	39
Quadro 5: Estruturas químicas de subincanandinas E e F	40
Quadro 6: Estrutura química da β-yoimbina	40
Quadro 7: Estruturas químicas de alcalóides com atividade antiplasmódica isolados de <i>A. pyrifolium</i> e <i>A. megalocarpon</i>	41
Quadro 8: Estruturas químicas de alcalóides isolados de <i>G. sericum</i>	42
Quadro 9: Estruturas químicas de substâncias isoladas de <i>A. parvifolium</i>	44
Quadro 10: Estruturas químicas de alcalóides isolados de <i>A. cylindrocarpon</i>	48
Quadro 11: Estruturas químicas de alcalóides isolados de <i>A. olivaceum</i>	49
Quadro 12: Estruturas químicas de alcalóides isolados de <i>A. ramiflorum</i>	50
Quadro 13: Estruturas químicas de alcalóides isolados de <i>A spruceanum</i>	53
Quadro 14: Estruturas químicas de alcalóides isolados de <i>A. tomentosum</i>	55
Quadro 15: Estruturas químicas de substâncias isoladas de espécies do gênero <i>Esenbeckia</i>	58
Quadro 16: Estruturas químicas de alcalóides de <i>Aspidosperma</i> submetidos a ensaios <i>in vitro</i> para atividade antiplasmódica e citotoxicidade descritos na literatura	130
Quadro 17: Estruturas químicas dos alcalóides furanoquinolinicos da Tabela 35	135

ÍNDICE DE TABELAS

	Nº de página
Tabela 1: Substâncias isoladas de espécies pertencentes ao gênero <i>Aspidosperma</i>	61
Tabela 2: Substâncias isoladas de espécies pertencentes ao gênero <i>Esenbeckia</i>	62
Tabela 3: Prospecção por CCDS e classes de metabólitos secundários nos extratos e frações: classes pesquisadas, eluentes e reveladores utilizados	75
Tabela 4: Dados referentes à coluna cromatográfica em sílica gel do APT-1 (1,0g)	79
Tabela 5: Dados referentes à coluna cromatográfica aberta do APT- F13- 16 (300mg)	80
Tabela 6: Esquema utilizado no preparo das placas utilizadas nos ensaios	84
Tabela 7: Condições de preparação dos extratos, quantidade do pó das plantas e rendimentos dos processos extractivos	89
Tabela 8: Resultados das análises, por CCDS e CLAE de extratos de espécies pertencentes ao gênero <i>Aspidosperma</i> (Apocynaceae)	94
Tabela 9: Resultados da avaliação da atividade antiplasmódica e citotoxicidade de extratos de espécies pertencentes ao gênero <i>Aspidosperma</i> (Apocynaceae)	96
Tabela 10: Índices de seletividade (IS) para extratos obtidos de diferentes espécies de <i>Aspidosperma</i> (Apocynaceae) ensaiadas para citotoxicidade e atividade antiplasmódica	98
Tabela 11: Rendimentos nas extrações de alcalóides a partir do extrato etanólico de cascas de <i>A. parvifolium</i>	99
Tabela 12: Análise do extrato etanólico de cascas de <i>Aspidosperma parvifolium</i> (Apocynaceae), frações e uleína, em CCDS e CLAE	100
Tabela 13: Análise em CLAE acoplado a detector com arranjos de diodos (DAD), do extrato etanólico de <i>A. parvifolium</i> (Apocynaceae), APT-1 e APT13-16 (8)	104
Tabela 14: Tempos de retenção da uleína, das frações APT 13-16 (7) e APT 13-16 (8)	105
Tabela 15: Atividade antiplasmódica, <i>in vitro</i> , pelo método tradicional, do extrato etanólico de cascas de <i>A. parvifolium</i> , frações e APT 13-16 (8) (uleína)	108
Tabela 16: Avaliação da atividade antiplasmódica, <i>in vitro</i> , pelo método radioisotópico, do extrato etanólico de cascas de <i>A. parvifolium</i> , frações e APT 13-16 (8) (uleína)	109
Tabela 17: Citotoxicidade e índice de seletividade de extrato etanólico de cascas de <i>Aspidosperma parvifolium</i> , frações e uleína	110
Tabela 18: Rendimento da extração ácido-base a partir do extrato etanólico de caules de <i>Esenbeckia febrifuga</i>	111
Tabela 19: Prospecção fitoquímica por CCDS e análises em CLAE do extrato etanólico de <i>E. febrifuga</i> , frações e substâncias.	113
Tabela 20: Atividade antiplasmódica, <i>in vitro</i> , através do método tradicional, do extrato etanólico, frações e substâncias de <i>E. febrifuga</i>	115
Tabela 21: Atividade antiplasmódica, <i>in vitro</i> , pelo método radioisotópico, do extrato etanólico de caules de <i>E. febrifuga</i> , frações e substâncias	115
Tabela 22: Citotoxicidade e índice de seletividade de extrato etanólico de caules de <i>E. febrifuga</i> e frações	116
Tabela 23: Atividade antiplasmódica da cloroquina e mefloquina pelos métodos tradicionais e radioisotópico encontradas no presente trabalho e descritas na literatura	117
Tabela 24: Correlação entre os resultados obtidos em CCDS, CLAE e atividade antiplasmódica de <i>A. cylindrocarpon</i>	118
Tabela 25: Correlação entre os resultados obtidos em CCDS, CLAE e atividade	

antiplasmódica de <i>A. olivaceum</i>	119
Tabela 26: Correlação entre os resultados obtidos em CCDS, CLAE e atividade antiplasmódica de <i>A. ramiflorum</i>	121
Tabela 27: Correlação entre os resultados obtidos em CCDS, CLAE e atividade antiplasmódica de <i>A. spruceanum</i>	122
Tabela 28: Correlação entre os resultados obtidos em CCDS, CLAE e atividade antiplasmódica de extratos etanólicos <i>A. tomentosum</i>	123
Tabela 29: Correlação entre os resultados obtidos em CCDS, CLAE e atividade antiplasmódica para o extrato etanólico de cascas de <i>A. parvifolium</i> , frações e uleína	125
Tabela 30: Correlação entre os resultados obtidos no microteste tradicional e o método isotópico	127
Tabela 31: Comparação do efeito antiplasmódico, citotoxicidade e índice de seletividade da uleína a outros alcalóides indólicos de <i>Aspidosperma</i> descritos na literatura	130
Tabela 32: Comparação do IS da uleína com os IS da cloroquina e mefloquina descritos na literatura	131
Tabela 33: Correlação entre os resultados obtidos em CCDS, CLAE e atividade antiplasmódica de <i>E. febrifuga</i> e frações	132
Tabela 34: Correlação entre os resultados obtidos no microteste tradicional e o método radioisotópico	133
Tabela 35: Comparação da atividade antiplasmódica de <i>E. febrifuga</i> dos alcalóides de <i>E. febrifuga</i> com os dados da literatura	134
Tabela 36: Comparação das atividades antiplasmódicas dos extratos avaliados	135
Tabela 37: Comparação das atividades antiplasmódicas das frações avaliados	136
Tabela 38: Comparação das atividades antiplasmódicas das frações avaliados	136

ÍNDICE DAS ESTRUTURAS QUÍMICAS

	Nºs das páginas
1- Quinina	25
2-Mefloquina	25
3- Cloroquina	25
4- Halofantrino	28
5- Artemisina	28
6- Atovacona	28
7- Artemeter	28
8- Arteer	28
9- Artesunato de sódio	28
10- Lapachol	28
11- Lumefantrina	28
12- Indol (benzopirrol)	34
13a-Oxindol	34
13b- Oxindol	34
14- Diidroindol	34
15- Secondina	36
16- Harmano	36
17- Elipticina	36, 39, 49, 129
18- Uleina	36, 44, 49, 55, 129
19- Epiuleína	36,44, 49, 55
20- Usambaresina	36
21- 10-11-Dimetoxipicrofilina	38
22- Diidrocorinateol	38
23-Tetraidrosecamina	38
24- Desmetoxicarboniltetraidrosecamina	38
25- Metoxitubotaiwina	38
26- Didesmetoxicarboniltetraidrosecamina	38
27- Elipticínium	39
28- Aspidoscarpina	39, 49
29- Subincanandina E	40
30- Subincanandina F	40
31- β - yoimbina	40
32- N-formil- aspidospermidina	41, 130
33- Aspidospermina	41
34- Geissoschizolina	42
35- Geissoschizolina N ⁴ - óxido	42
36- 1,2- Desidrogeissoschizolina	42
37- Flavopereirina	42
38-N- metiltetraidroelipticina	44
39- Aparicina	44, 49, 129
40- Desmetiluleína	44
41-Lupeol	44
42- Estigmasterol	44
43- Refractina	48
44- Pirifolina	48
45- Pirifolidina	48
46- N-cinamoilcilstrocarina	48
47- N-acetilcilstrocarina	48

48- Cilindrocarina	48
49- N-benzoilcilindrocarina	48
50- N- metilcilindrocarina	48
51- 12- Desmetoxi-N-acetilcilindrocarina	48
52- 19- Hidroxicilindrocarina	48
53- N-diidrocinomoil-19-hidroxicilindrocarina	48
54- N-acetil-19-hidroxicilindrocarina	48
55- N-cinamoil-19-hidroxicilindrocarina	48
56- N-formilcilindrocarpinol	48
57- Cilindrocarpinol	48
58- N-acetilcilindrocarpinol	48
59- Olivacina	49
60- 10- Metoxigeissochizol	50
61- Ramiflorina A	50
62- Ramiflorina B	50
63- Aspidoalbina	53
64- Acetilaspidoalbina	53
65- Desmetilaspidolimidina	53
66- Limatinina	55
67- Limonina	58
68- Kokusaginina	58, 112
69- Dictamina	58
70- Skimmiamina	58, 112, 134
71- γ-Fagarina	58, 112
72- Maculina	58
73- Flindersiamina	58, 112, 134
74- Bergapteno	58, 112
75- 8- Hidroxibergapteno	58
76- Isopimpinelina	58, 112
77- Xantotoxina	58
78- Pimpinelina	58
79- Chalepina	58
80- Arilquinolonas	59
81- Arilquinolonas	59
82- Espatulenol	59
83- β-sitosterol	59
84- Valenol	60
85- Arilquinolona	60
86- Arilquinolona	60
87- Kampferol-3-O-ramnosídeo	60
88- Quercetina-3-O-ramnosídeo	60
89- 1-Hidroxi-3-metoxi-N-metilacridona (HMMA)	112
90- Rutaevina	112
91-10-Metoxi-aspidospermidina	130
92- Aspidospermidina	130
93- Palosina	130
94- Aspidolimidina	130
95- Haplopidina	134
96- Acronidina	134

1- INTRODUÇÃO

A malária é uma doença infecciosa cujos agentes etiológicos são protozoários do gênero *Plasmodium*, filo Apicomplexa, classe Sporozoa, ordem Hemosporidiida e família Plasmodidae. Quatro espécies de plasmódios infectam o homem:

- *Plasmodium malariae*, agente da febre quartã, muito encontrada no continente africano; foi descoberto por Laveran, em 1881, e Grassi e Faletti, em 1890;
- *Plasmodium vivax*, responsável pela terçã benigna, sendo este o principal agente causador de malária no Brasil; foi descoberto por Grassi e Faletti, em 1890;
- *Plasmodium falciparum*, responsável pela terçã maligna, isto é, pela forma mais grave da doença; foi descoberto por Welch, em 1897; e
- *Plasmodium ovale*, causador de uma forma de terçã benigna, encontrada nos continentes africano e asiático; foi descoberto por Stephens, em 1922.

O *Plasmodium* se reproduz por dois processos distintos: a reprodução assexuada, denominada esquizogonia, que se desenvolve no hospedeiro vertebrado, e a reprodução sexuada que ocorre no mosquito. Ao picar o homem, o mosquito, do gênero *Anopheles*, inocula os esporozoítos, que permanecem no sangue por tempo reduzido e vão para os hepatócitos, onde se multiplicam assexuadamente, dando origem aos esquizontes teciduais, que amadurecem e liberam os merozoítos. Alguns merozoítos vão parasitar as hemárias, onde sofrem maturação transformando-se em trofozoítos que se multiplica por esquizogonia sanguínea, originando os esquizontes. Assim, as hemárias parasitadas se rompem e liberam os merozoítos que irão parasitar outras hemárias (Figura 1, pg. 23), iniciando-se os sintomas da doença.

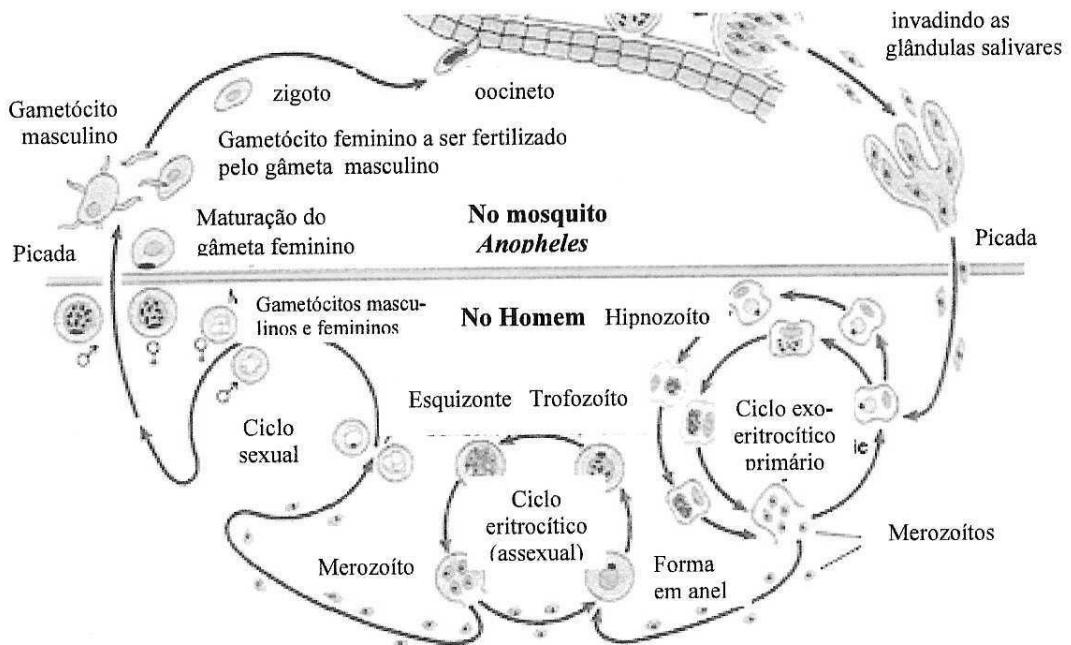


Figura 1: Ciclo de vida dos parasitos da malária humana.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) considera a malária o maior problema de saúde pública, pois, estima-se que, a cada ano, cerca de 300 a 500 milhões de pessoas sejam infectadas, sendo os países da África responsáveis por 90% dos casos (Figura 2, pg. 24). A mortalidade, em especial em crianças menores de cinco anos e gestantes, é bem expressiva, chegando a ocorrer mais de um milhão de óbitos por ano (MINISTÉRIO DA SAÚDE-BRASIL, 2006).

Nas Américas, o Brasil é o país que mais registra casos de malária, sendo os estados da Amazônia Legal (AC, AP, AM, MA, MT, AP, RO, RR, TO) são responsáveis por 99,7% dos casos nacionais (Figura 2, pg. 24) (MINISTÉRIO DA SAÚDE-BRASIL, 2006).

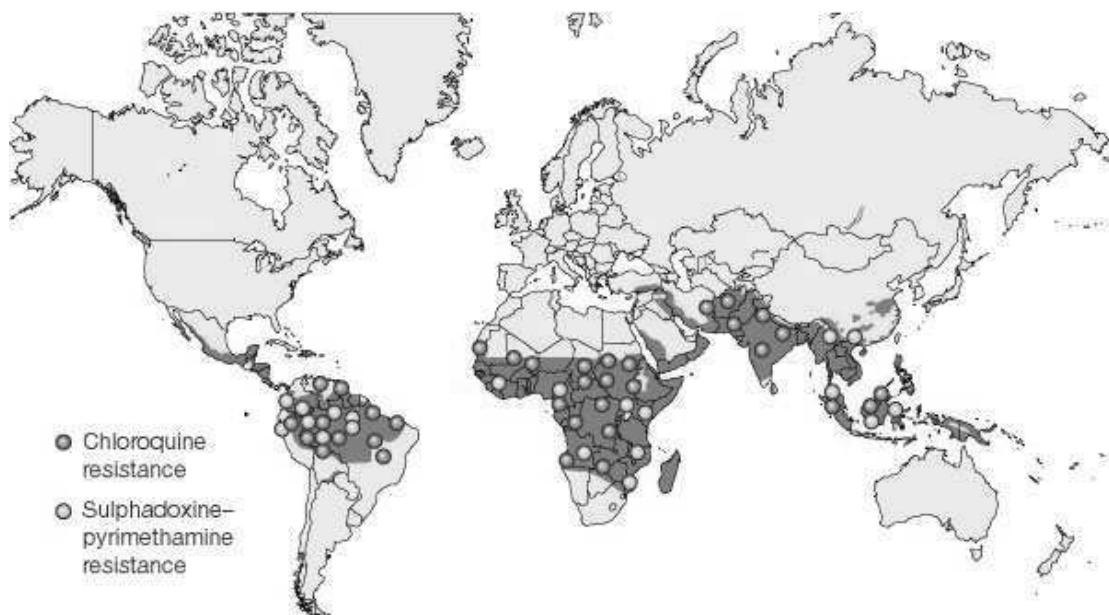


Figura 2: Distribuição de malária no mundo, perfil da resistência a cloroquina e a sulfadoxina.

Fonte: Ridley, 2002.

A evidente necessidade de tratar a malária conduziu a descoberta de vários fármacos. A quimioterapia da malária teve início no século XVII. Os jesuítas que vieram para a América do Sul observaram que os índios do Perú utilizavam plantas do gênero *Cinchona* spp (família Rubiaceae), conhecidas popularmente por quinas, para o tratamento de doenças febris. Estudos fitoquímicos de *Cinchona* spp, realizados na Europa, levaram ao isolamento na França, por Pelletier e Caventou, no início do século XIX, da quinina (1) que apresentou atividade antimalária.

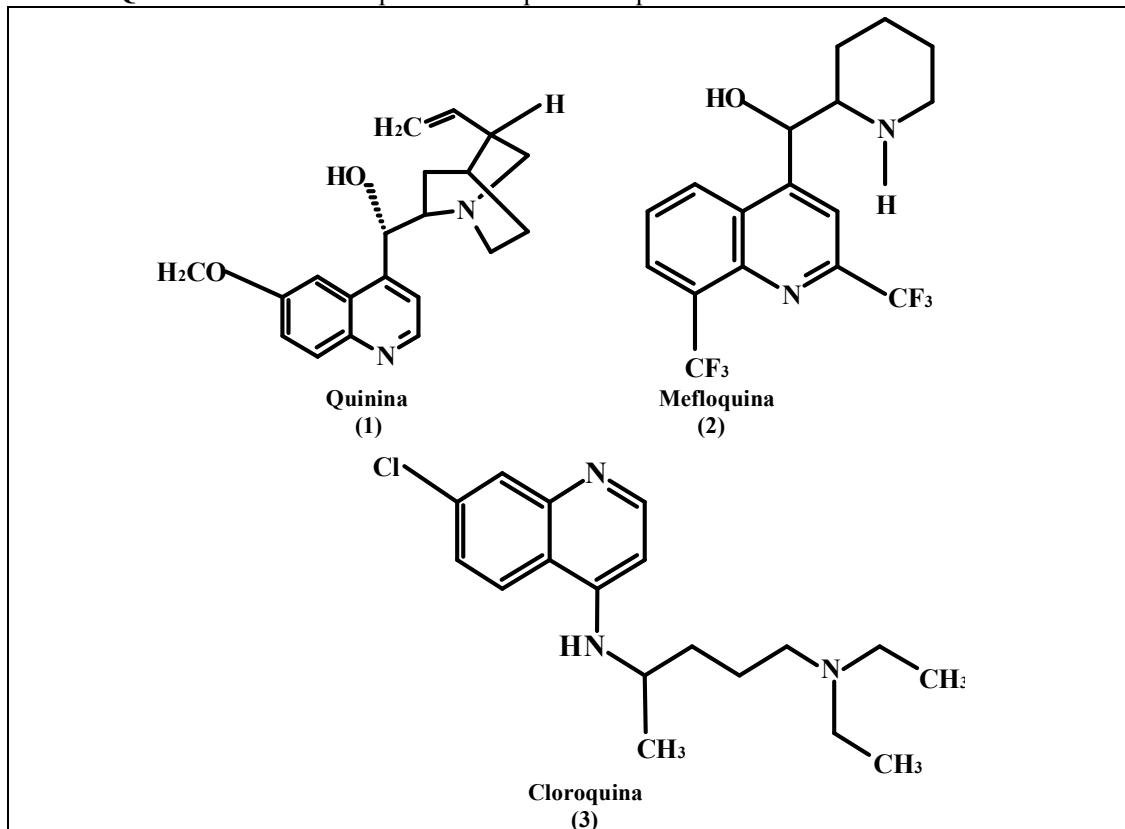
Até a 2^a Guerra Mundial, a quinina (1) era o único agente antiparasitário eficaz frente à malária. Após a introdução de derivados sintéticos, como a mefloquina (2) e cloroquina (3), a quinina (1) foi descartada (Quadro 1, pg. 25). Entretanto, com o aparecimento de cepas resistentes de *Plasmodium*, a quinina (1) foi reintroduzida.

Os fármacos utilizados para o tratamento da malária humana classificam-se com base em suas ações seletivas sobre as diferentes fases do ciclo biológico do parasito. Fármacos que atuam sobre as formas hepáticas em desenvolvimento, ou em latência são denominados esquizonticidas teciduais. Aqueles que atuam sobre os parasitos eritrocíticos

são chamados de esquizonticidas sanguíneos. O último grupo de fármacos antimaláricos é dos gametocidas, isto é, que atuam nos gametócitos, impedindo a transmissão para o mosquito.

A terapêutica da malária humana visa, principalmente, a interrupção da esquizogonia sanguínea, responsável pela patogenia e manifestações clínicas da doença. Entretanto, devido à diversidade de formas do ciclo biológico, é também objetivo da terapêutica propiciar a erradicação das formas latentes do parasito no ciclo tecidual (hipnozoítos) do *P. vivax*, evitando-se assim, as recaídas tardias (MINISTÉRIO DA SAÚDE- BRASIL, 2005).

Quadro 1: Estruturas químicas da quinina e quinolinas antimaláricas sintéticas.



A cloroquina (3), por apresentar baixa toxicidade e ser economicamente viável, foi amplamente utilizada no tratamento da malária, durante muitos anos. Durante a guerra do Vietnã, as forças armadas dos Estados Unidos observaram que os parasitos da malária eram resistentes à cloroquina. Atualmente, parasitos resistentes a cloroquina e a sulfadoxina encontram-se distribuídos em várias regiões do mundo (Figura 2, pg.24). Então, iniciou-se um programa intensivo de pesquisa de novos agentes antimaláricos, onde foram testados mais de 300.000 compostos, sendo dois compostos ativos contra cepas resistentes ao *P. falciparum*: a mefloquina (2), um quinolinometanol, e o halofantrino (4), um fenantrenometanol (FOLEY e TILLEY, 1998). Os fármacos mais recentemente introduzidos são a artemisinina (5) e a atovacona (6) (Quadro 2, pg. 27).

A artemisinina (5) é uma substância ativa da *Artemisia annua*, de uso milenar na China, tendo sido isolada em 1972. Derivados semi-sintéticos como artemeter (7), arteeter (8) e artesunato de sódio (9) também se encontram em uso clínico (Quadro 2, pg. 27) (ROSENTHAL *et al.*, 2003). A atovacona (6) é uma naftoquinona sintética, um análogo do lapachol (10), que é freqüente em espécies de *Tabebuia*, gênero ao qual pertencem os ipês, árvores que ocorrem na América do Sul (MIRAGLIA, 1991).

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

Existem algumas evidências que a interação entre os antimaláricos esquizonticidas sangüíneos com o grupo heme [ferriprotoporfirina IX (Fe(III)PPIX)] interferindo na cristalização da hemozoína (SULIVAN Jr. *et al.*, 1998), porém, existem divergências sobre como isto ocorre (EGAN *et al.*, 1999).

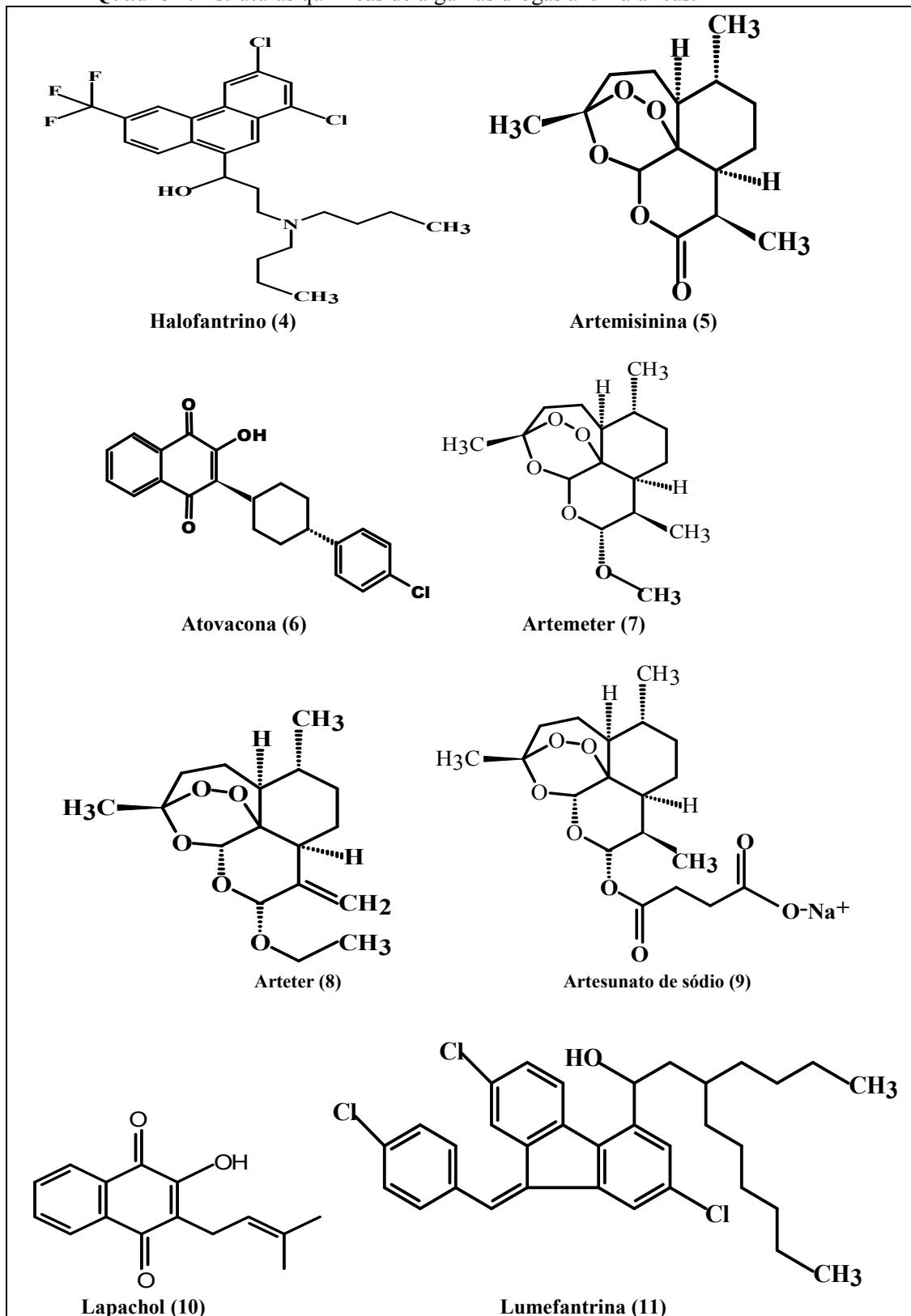
A resistência do *P. falciparum* e, em menor grau, do *P. vivax*, constitui um sério problema de saúde pública. No Brasil, o *P. falciparum* resistente a cloroquina é muito freqüente na Amazônia legal, onde também já foram encontrados parasitos multiresistentes. Assim, preconiza-se o tratamento com associações de antimaláricos que tem como objetivos melhorar a eficiência do tratamento e com sensível diminuição no desenvolvimento de resistência (GIAO e VRIES, 2001).

Atualmente, o Ministério da Saúde do Brasil recomenda, para o tratamento da malária causada pelo *P. vivax*, a cloroquina e a primaquina. Para o tratamento da malária *falciparum* humana recomenda-se a associação artemeter (7) e lumefantrina (11) (Coartem). A escolha do derivado da artemisinina (5), o artemeter (7), para esta associação, fundamenta-se no fato de não haver registro de cepas do *P. falciparum* resistentes a esta droga. As principais mutações, responsáveis pela resistência do *P. falciparum*, ocorre, nos gene *pcfcrt* e *pfmdr1* e confere altos níveis de resistência a cloroquina, porém não interfere na atividade da artemisinina e derivados. O gene candidato a conferir resistência à artemisina e derivados, já identificado, foi o *PfATPse6* (FERREIRA *et al.*, 2007).

Atualmente, existe necessidade de buscar novos agentes antimaláricos que sejam eficazes contra cepas do *P. falciparum* resistentes a cloroquina, promovendo a cura em tempo razoável (3 dias), para garantir adesão ao tratamento, sejam seguros e de baixo custo (FIDOCK *et al.*, 2004).

Neste contexto, as plantas têm dado importante contribuição, como a quinina (1) e a artemisinina (5). A mais ampla avaliação de plantas superiores para atividade antimalária foi publicada em 1947, sendo que cerca de 600 espécies vegetais foram examinadas *in vivo* empregando-se *P. galinaceum*, em galinhas, além de *P. catherenierium* e *P. lophurae*, em patos, destacando-se as atividades de representantes das famílias Amaryllidaceae e Simaroubaceae. O total de extratos ativos foi relativamente baixo já que a atividade em malária aviária não é, necessariamente, indicadora de atividade antimalária em humanos e estes resultados desestimularam as investigações na área (PHILLIPSON e WRIGHT, 1991). Um levantamento da literatura indicou que 1200 espécies vegetais são empregadas nos três continentes para o tratamento da malária (WILLCOX e BODEKER, 2004).

Quadro 2: Estruturas químicas de algumas drogas antimaláricas.



A atividade antiplasmódica de alcalóides tem sido amplamente relatada na literatura, sendo que no período de 1990 a 2000 mais de uma centena de substâncias ativas desta classe foram descritas e algumas mais potentes que a cloroquina, conforme revisão recente (SAXENA *et al.*, 2003). Muitas vezes estes alcalóides foram isolados de plantas tradicionalmente utilizadas para o tratamento da malária, em diferentes regiões do mundo.

A importância da pesquisa de plantas tradicionalmente utilizadas no tratamento da malária, seja na busca de novos fármacos, ou objetivando a validação do seu uso medicinal e/ou o desenvolvimento de fitoterápicos eficazes e seguros, consta de um artigo submetido para publicação nos Anais da Academia Brasileira de Ciências, em que somos um dos autores e encontra-se em anexo (OLIVEIRA *et al.*, 2007). Nesta revisão estão descritos os ensaios *in vitro* mais utilizados para a avaliação da atividade antiplasmódica, sendo dado um maior destaque aos ensaios descritos por Rieckman e col.(1978), onde a parasitemia é determinada em análises microscópica, e por Desjardins e col (1979), que é um método radioisotópico onde é utilizada a $[H^3]$ - hipoxantina. Além disso, outras metodologias mais recentes são discutidas nesta revisão, dentre estas o método que utiliza cepa de *P. falciparum* contendo proteína fluorescente (SANCHES *et al.*, 2007), método fluorimétrico que utiliza PicoGreen® para avaliar a susceptibilidade de parasitos a agentes antiplasmódicos (QUASHIE *et al.*, 2006). Também, alguns métodos bioquímicos baseados em ensaios colorimétricos foram descritos, como por exemplo, aquele para detecção da desidrogenase lática (OLIVEIRA *et al.*, 2007).

2- OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA

2.1- OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antiplasmódica de extratos obtidos de espécies pertencentes ao gênero *Aspidosperma* (família Apocynaceae) e de *Esenbeckia febrifuga* (A.St-Hil.) Juss. ex Mart. (família Rutaceae); realizar o estudo fitoquímico de extratos de uma das espécies ativas e determinar a citotoxicidade de extratos, frações e substância(s) pura(s) ativa(s).

2.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a- Avaliar a atividade antiplasmódica de extratos obtidos a partir de diferentes partes de plantas das seguintes espécies: *A. cylindrocarpon* Muell. Arg., *A. olivaceum* Muell. Arg., *A. parvifolium* A. DC., *A. ramiflorum* Mgf., *A. spruceanum* Benth. ex. Muell. Arg., *A. tomentosum* Mart. e *Esenbeckia febrifuga* (A.St-Hil.) Juss. ex Mart..
- b- Realizar estudos fitoquímicos preliminares dos extratos obtidos.
- c- Realizar estudo fitoquímico de extrato e/ou fração ativa de uma espécie vegetal a ser selecionada de acordo com os resultados obtidos nos estudos fitoquímicos preliminares.

2.3- JUSTIFICATIVA

Considerando que a família Apocynaceae é uma reconhecida fonte de alcalóides (BOLZANI *et al.*, 1987 e JÁCOME, 1998) justifica-se a proposta de avaliação da atividade antiplasmódica de extratos de espécies do gênero *Aspidosperma*, pertencentes a esta família. Essa abordagem baseia-se em critérios válidos para a seleção de espécies vegetais para avaliação de atividade antiplasmódica:

- 1)- Etnobotânica: espécies de *Aspidosperma* são empregadas no tratamento da malária, em diferentes continentes (BARBOSA *et al.*, 2003);

2)- Etnofarmacologia: *Aspidosperma megalocarpon* mostrou atividade antimalária (WENIGER *et al.*, 2001) e

3)- Quimiotaxonomia: espécies do gênero *Aspidosperma* já forneceram alcalóides indólicos com atividade antimalária (MITAINE-OFFER *et al.*, 2002).

A inclusão do estudo da *Esenbeckia febrifuga* (A. St-Hil.) Juss. ex Mart. tem como objetivo dar continuidade ao trabalho iniciado em 1990 pela Profa. Alaíde Braga de Oliveira, em colaboração com o Prof. H. Wagner (Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität München, Alemanha), com o apoio do CNPq (Processo nº.91.03006/90-7). A atividade antiplasmódica, *in vivo*, do extrato aquoso de cascas desta espécie foi anteriormente relatada (CARVALHO *et al.*, 1991).

Na seleção da espécie para fracionamento foram levadas em consideração as seguintes informações:

1- Extratos de *A. olivaceum* mostraram-se ativos em *P. falciparum*, e isto deve estar relacionado à presença dos alcalóides elipticina, aspidocarpina (ANDRADE-NETTO *et al.*, 2007). A citotoxicidade da elipticina e da olvacina, agentes antitumorais, tem sido relatada em diferentes trabalhos científicos (MARINI *et al.*, 1983 e LE MÉE *et al.*, 1998). Por isso, optou-se por selecionar uma planta que não contivesse elipticina e olvacina.

2- A maioria dos extratos testados das demais espécies de *Aspidosperma* apresentou CI₅₀ superior a 10 µg/mL e, analisando os dados da literatura, conclui-se que:

a)- Devido a sua complexidade química, isto é, a presença de diferentes alcalóides indólicos (GILBERT *et al.*, 1960; ANTONACCIO, 1960; DJERASSI *et al.*, 1960 e 1961; BOLZANI *et al.*, 1987), o estudo fitoquímico da *A. cylindrocarpon* seria muito complexo e por isso, excluiu-se esta espécie.

b)- As demais espécies apresentavam atividade antiplasmódica e complexidade de composição em alcalóides semelhantes, porém a espécie *A. parvifolium* já havia sido estudada pelos pesquisadores do grupo (JÁCOME, 1998 e JÁCOME *et al.*, 2004), o que

com certeza, facilitaria o fracionamento biomonitorado. Assim, optou-se pela *A. parvifolium* para dar continuidade ao trabalho.

3- REVISÃO DA LITERATURA

3.1- O gênero *Aspidosperma*: posição taxonômica, alcalóides, etnofarmacologia e atividades biológicas

3.1.1- Posição taxonômica

O gênero *Aspidosperma* pertence à família Apocynaceae que inclui cerca de 200 gêneros e 2000 espécies. Espécies deste gênero ocorrem em regiões tropical e subtropical, desde o México até a Argentina, encontrando-se em diferentes habitats, como nos cerrados da região centro sul do Brasil, áreas inundadas nas margens de rios da Amazônia, Paraguai, Argentina, México e regiões em elevação do Perú e Bolívia (WOODSON, 1951 apud JÁCOME, 1998 e FERREIRA NETO, 1988 apud JÁCOME, 1998).

O número de espécies é bastante controverso. A última revisão do gênero é a mais usada para determinações taxonômicas, e considera 52 espécies distribuídas em 9 séries (WOODSON, 1951 apud JÁCOME, 1998). Em uma reavaliação, 18 espécies foram incluídas no gênero (FERREIRA NETO, 1988 apud JÁCOME, 1998 e MARCONDES e KINOSHITA, 1996).

De espécies do gênero *Aspidosperma* já foram isolados cerca de 250 alcalóides indólicos (BOLZANI *et al.*, 1987; JÁCOME, 1998; PEREIRA *et al.*, 2007). Esta classe de alcalóides ocorre mais frequentemente em plantas das famílias Apocynaceae, Loganiaceae e Rubiaceae que pertencem à ordem Gentianales. As Apocináceas das quais foram isolados alcalóides indólicos pertencem à sub-família Plumerioideae K. Schumann. Na tribo Plumeriae, sub-tribo Aspidospermatinae, encontram-se os gêneros *Aspidosperma* e *Geissospermum* (LEEUWENBERG, 1980). Estas relações taxonômicas são mostradas a seguir:

Classe: Magnoliopsida

Ordem: Gentianales

Família: Apocynaceae

Sub-família: Plumeriodiae

Tribo: Plumeriae

Sub-tribo: Aspidospermatinae

Gêneros: *Diplorhynchus*

Aspidosperma

Geissospermum

3.1.2- Alcalóides indólicos

Estruturalmente os alcalóides indólicos caracterizam-se por apresentar o núcleo indol (benzopirrol) (12), uma forma oxidada deste, o oxindol (13 a e b), ou a forma reduzida, diidroindol (14) (Figura 3, pg. 34).

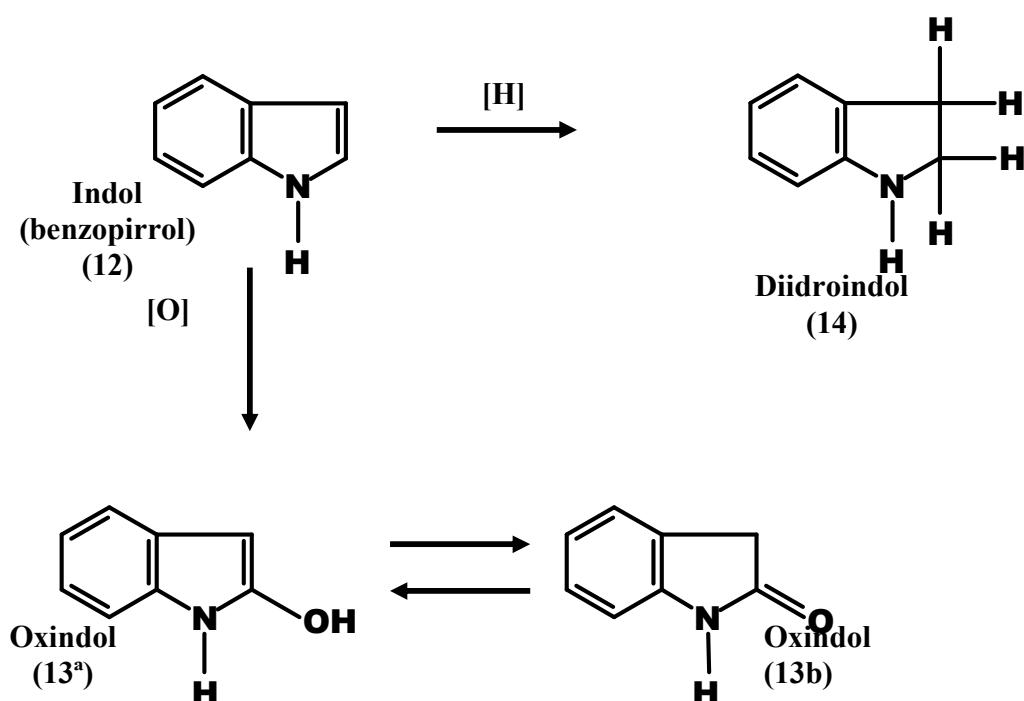


Figura 3: Núcleo indólico e suas formas reduzida e oxidada.

Os alcalóides indólicos encontrados em espécies de *Aspidosperma* são classificados em dois grupos:

- 1- Alcalóides indólicos simples, com um sistema indólico derivado biogeneticamente do triptofano, alguns apresentando um esqueleto piridino-indólico. Este grupo possui poucos representantes em *Aspidosperma* (<20) e pode ser exemplificado por secondina (15), harmano (16) e elipticina (17) (Figura 4, pg. 36);
- 2- Alcalóides indolomonoterpênicos, biogeneticamente derivados do triptofano, via condensação da triptamina como a secologanina, um monoterpeno. A este grupo pertence a grande maioria dos alcalóides de *Aspidosperma* (>200). Estes alcalóides podem apresentar uma grande diversidade estrutural, compreendendo dez diferentes classes (SCHRIJIPSEMA *et al.*, 1999). O tipo aspidospermano é, aqui, exemplificado por uleína (18), epiuleína (19) e usambarensina (20) (Figura 4, pg. 36).

A Figura 4 (pg. 36) mostra, de forma esquemática, a origem biogenética das 2 classes de alcalóides de *Aspidosperma*: alcalóides indólicos simples e alcalóides indolomonoterpênicos.

3.1.3- Etnofarmacologia

Em relação ao uso tradicional e à atividade farmacológica de espécies deste gênero muito pouco se encontra registrado na literatura. Levantamento etnofarmacológico realizado no município de Igarapé Mirim (PA, Brasil) revelou que a população local utiliza cascas de *Aspidosperma*, entre as quais, *A. auriculatum*, para o tratamento de malária e febre (BARBOSA *et al.*, 2003).

De modo geral, na Amazônia, algumas espécies de *Aspidosperma* são utilizadas pelas populações indígenas e caboclas (MILLIKEN, 1997), para vários fins medicinais, como o tratamento de inflamações do útero e ovário, diabetes, câncer, como contraceptivo e tratamento da malária. As espécies mais utilizadas são *A. nitidum*, *A. marcgravianum*, *A. carapanauba* e *A. desmantur* (BRANDÃO *et al.*, 1992 e MILLIKEN, 1997).

A espécie *A. quebracho-blanco* é usada como febrífugo, para o tratamento de asma, bronquite, enfisema e febre (BOWN, 1995). *A. excelsum* é indicada para problemas estomáquicos e indigestão (CHEVALIER, 1996).

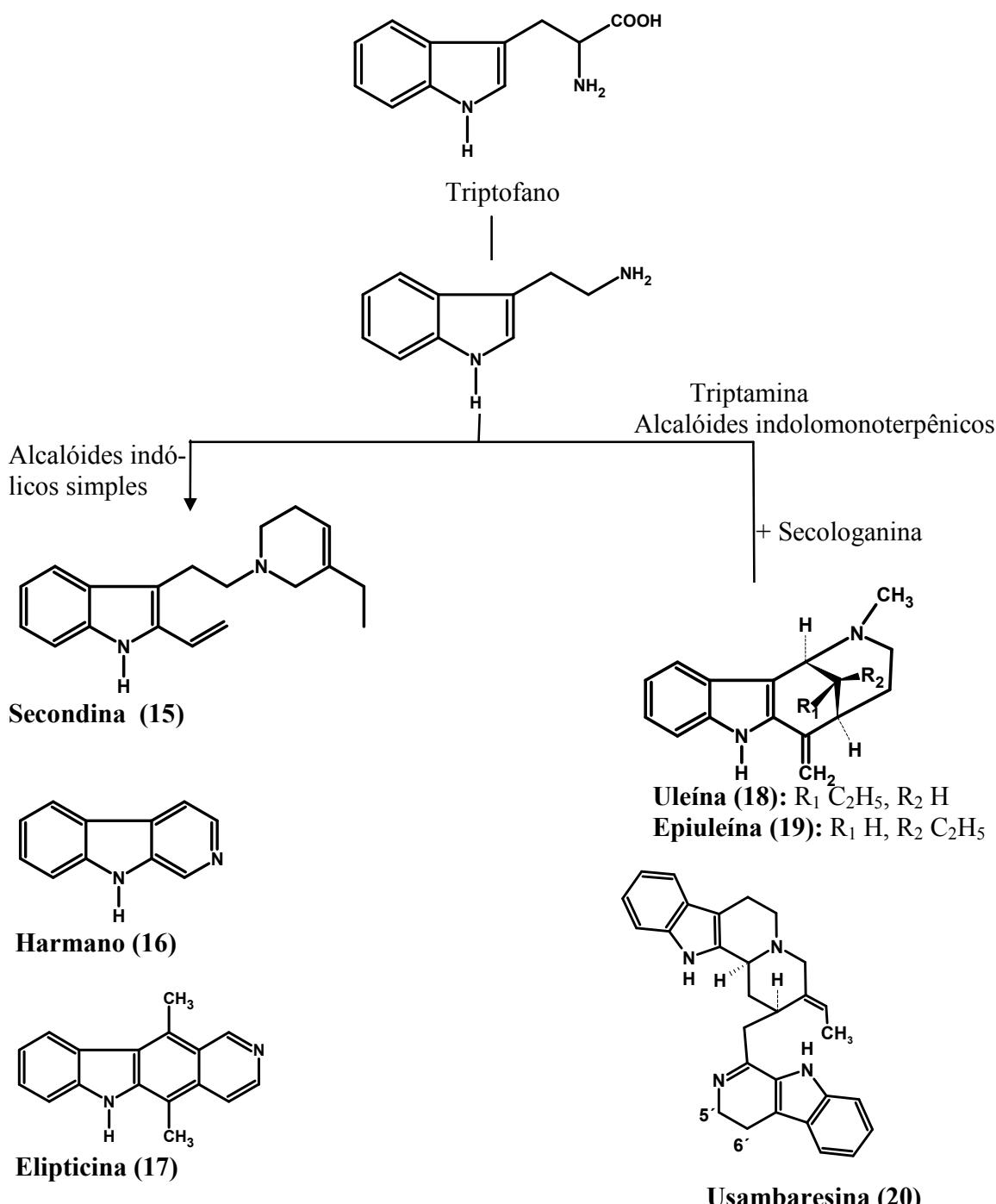


Figura 4: Alguns tipos de alcalóides indólicos isolados de espécies do gênero *Aspidosperma*.
 Fonte: SCHRIPSEMA *et al*, 1999 e JACOME, 1998.

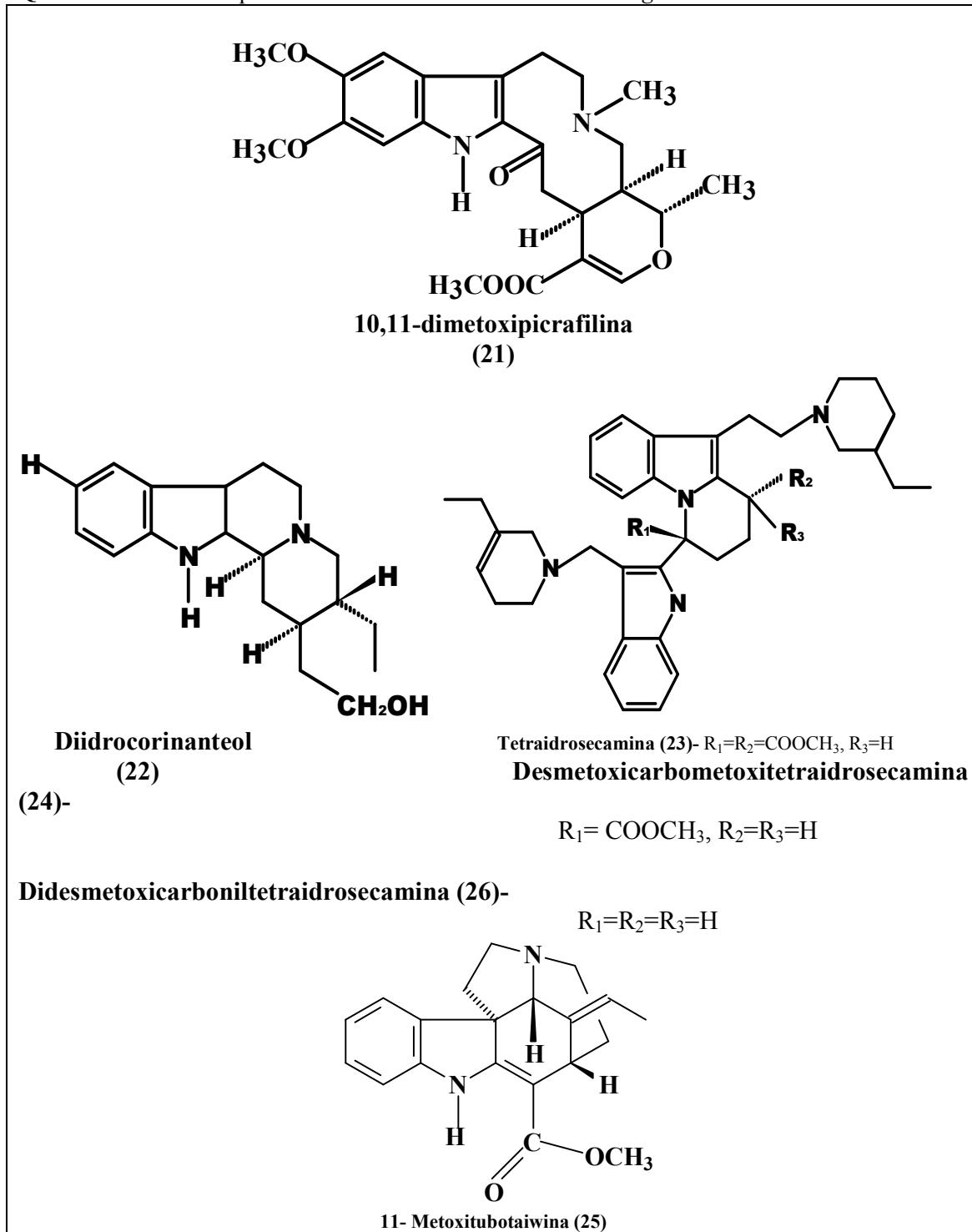
O extrato etanólico de peroba-rosa (*Aspidosperma* sp) mostrou-se muito ativo em *Proteus mirabilis* (GRANATO *et al.*, 2005). A atividade antibacteriana de extratos etanólicos de outras espécies de *Aspidosperma*, como *A. dispermum*, *A. olivaceum*, *A. pyrifolium*, *A. pyricollum*, *A. polyneuron* e *A. ramiflorum* foi observada em bactérias Gram positivas e negativas (OLIVEIRA *et al.*, 2005).

Extratos etanólicos de cascas e de frações de sete espécies de *Aspidosperma*, coletadas na Reserva de Ducke, Manaus, foram avaliados quanto à toxicidade para larvas de *Artemia franciscana* na concentração de 500 µg/mL. Os extratos apresentaram baixa toxicidade (0-64%), com exceção do extrato de *A. nitidum* que causou 97% de letalidade das larvas. As frações alcaloídicas de *A. aracanga*, *A. desmanthun* e *A. nitidum* apresentaram letalidade > 90%. Estes mesmos extratos e frações foram avaliados quanto à letalidade para larvas (3º estágio) de *Aedes aegypti*. Os extratos etanólico foram, em geral, inativos; apenas *A. marcgravianum* causou 10% de letalidade. As frações alcaloídicas apresentaram atividade de fraca a moderada (letalidade de 10 a 47%) (HENRIQUE, 2007).

Atividades de extratos de espécies de *Aspidosperma* estudadas neste trabalho serão descritas nos ítems referentes à sua revisão de literatura.

Em triagem para atividade antimicrobiana de constituintes químicos de plantas do Suriname, alcalóides de *A. marcgravianum* foram testados em *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*. O alcalóide 10,11-dimetoxipicrafilina (21) não foi ativo nestas bactérias. O diidrocorticanteol (22) mostrou atividade moderada para essas bactérias e tetraidrosecamina (23) e 16-desmetoxicarbometoxitetraidrosecamina (24) foram muito ativas para as duas bactérias (VERPOORTE *et al.*, 1982). Seis alcalóides, isolados de *A. excelsum* mostraram-se ativos em *B. subtilis* e suas concentrações inibitórias mínimas (CIM) foram: 11-metoxitubaiwina (25) (0,23 µg/mL); tetraidrosecamina (23) (0,11 µg/mL); 16-desmetoxicarboniltetraidrosecamina (24) (0,07 µg/mL) e didesmetoxicarboniltetraidrosecamina (26) (0,10 µg/mL) (VERPOORTE *et al.*, 1983).

Quadro 3: Estruturas químicas de alcalóides isolados de *A. marcgravianum* e *A. excelsum*.



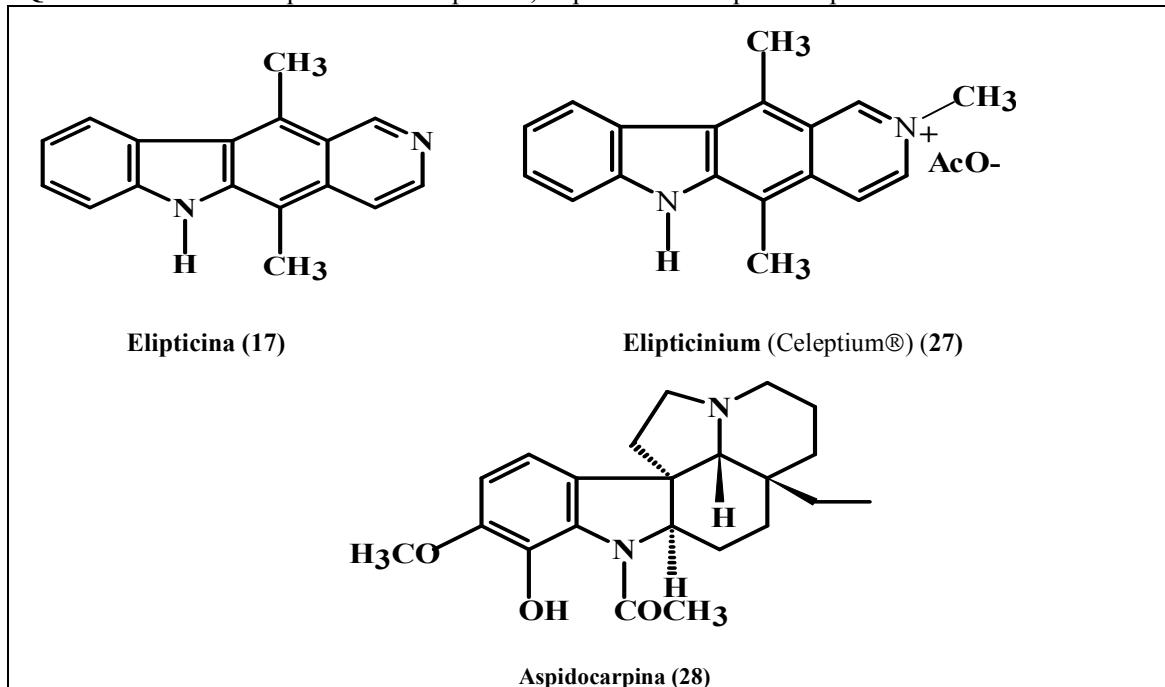
Fonte: JÁCOME, 1998.

Também, foi avaliada a atividade anticâncer de substâncias isoladas de espécies de *Aspidosperma*, destacando-se os trabalhos com a elipticina (17) e seus derivados sintéticos, dos quais o elipticinium (acetato de 2-metil-9-hidroxielipticínio) (27), é comercializado com o nome de Celiptium® (Elipticinium) (27), na França, para o tratamento do câncer de mama (CRAGG e NEWMANN, 2005).

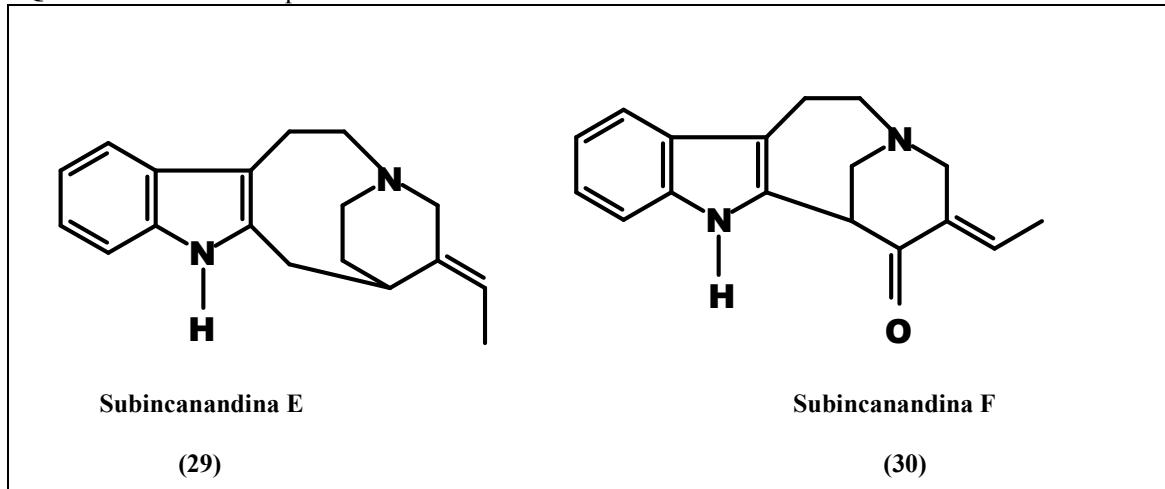
As subincanandinas E (29) e F(30), isoladas de *A. subincanum*, apresentaram atividade citotóxica *in vitro* em células de linfoma murino L1210 ($IC_{50} = 0,03$ e $2,4 \mu\text{g/mL}$, respectivamente) e em carcinoma epidermóide humano KB ($IC_{50} = 4,4$ e $4,8 \mu\text{g/mL}$, respectivamente) (Quadro 5, pg. 41) (KOBAYASHI *et al.*, 2002).

Trabalho recente demonstrou que elipticina (17) e aspidocarpina (28) (Quadro 4, pg. 40) apresentaram maior atividade antiplasmódica, *in vitro*, que a quinina, no clone K1 (*Plasmodium falciparum* multi-resistente, originário do Quênia) (ANDRADE-NETTO *et al.*, 2007).

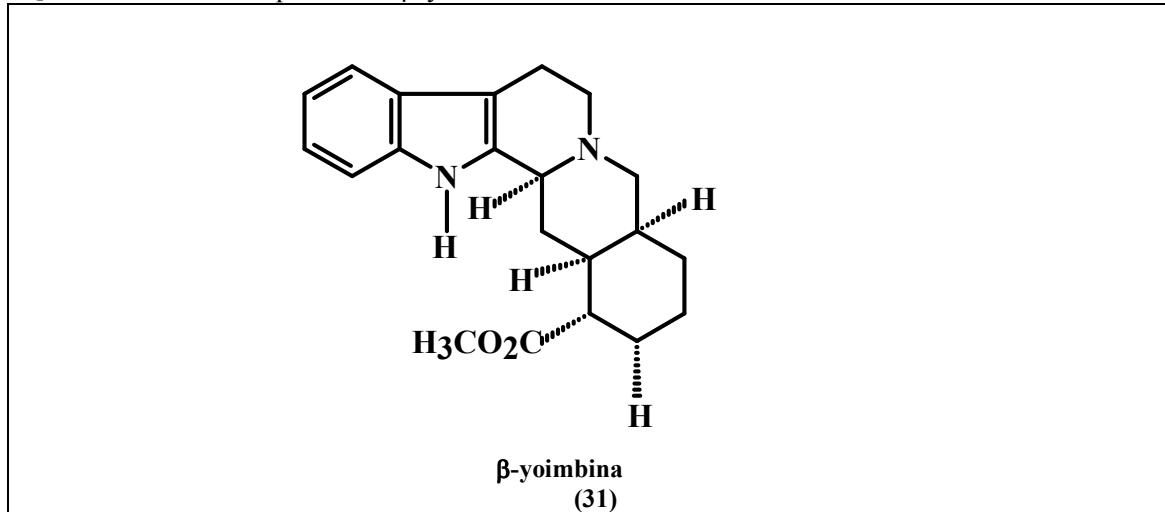
Quadro 4: Estruturas químicas da elipticina, elipticínium e aspidocarpina.



Legenda: JÁCOME, 1998.

Quadro 5: Estruturas químicas das subincanandinas E e F.**Legenda:** JÁCOME, 1998.

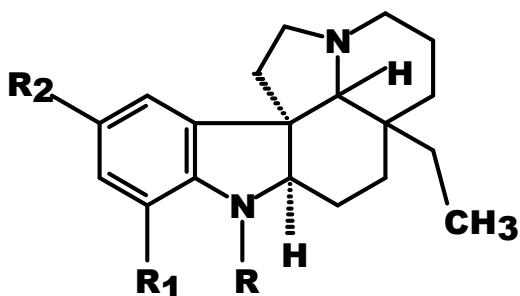
Outras atividades já relatadas foram os efeitos da β -yoimbina (31) na disfunção erétil e a inibição de receptor adrenérgico alfa (Quadro 6, pg. 40) (SPERLING *et al.*, 2002 e CAMPOS *et al.*, 2006).

Quadro 6: Estrutura química da β -yoimbina.**Legenda:** JÁCOME, 1998.

Mitaine-Offer e cols. (2002) isolaram de *A. pyrifolium* e *A. megalocarpon* onze alcalóides com esqueleto aspidospermano e avaliaram sua atividade antiplasmódica (cepas

sensível e resistente a cloroquina) e citotoxicidade. Destes alcalóides, sete são tetracílicos, apresentando grupo etila livre, e mostraram CI_{50} entre 3,2 e 15,4 μM , após 72h de exposição. Entretanto, quatro alcalóides pentacílicos mostraram reduzida atividade antiplasmódica, isto é, CI_{50} entre 22,6 e 52,6 μM . Avaliou-se, também, a associação alcalóide e cloroquina, tendo observado sinergismo nas seguintes associações: cloroquina - N-formil-aspidospermidina (32) e cloroquina- aspidospermina (33) (Quadro 7, pg. 41). Em relação à citotoxicidade (células NiH 3T3), os alcalóides com alta atividade antiplasmódica apresentaram menor citotoxicidade.

Quadro 7: Estruturas químicas de alcalóides com atividade antiplasmódica isolados de *A. pyrifolium* e *A. megalocarpon*.



N-formil-aspidospermidina (32): R = HCO, R₁= H, R₂= H

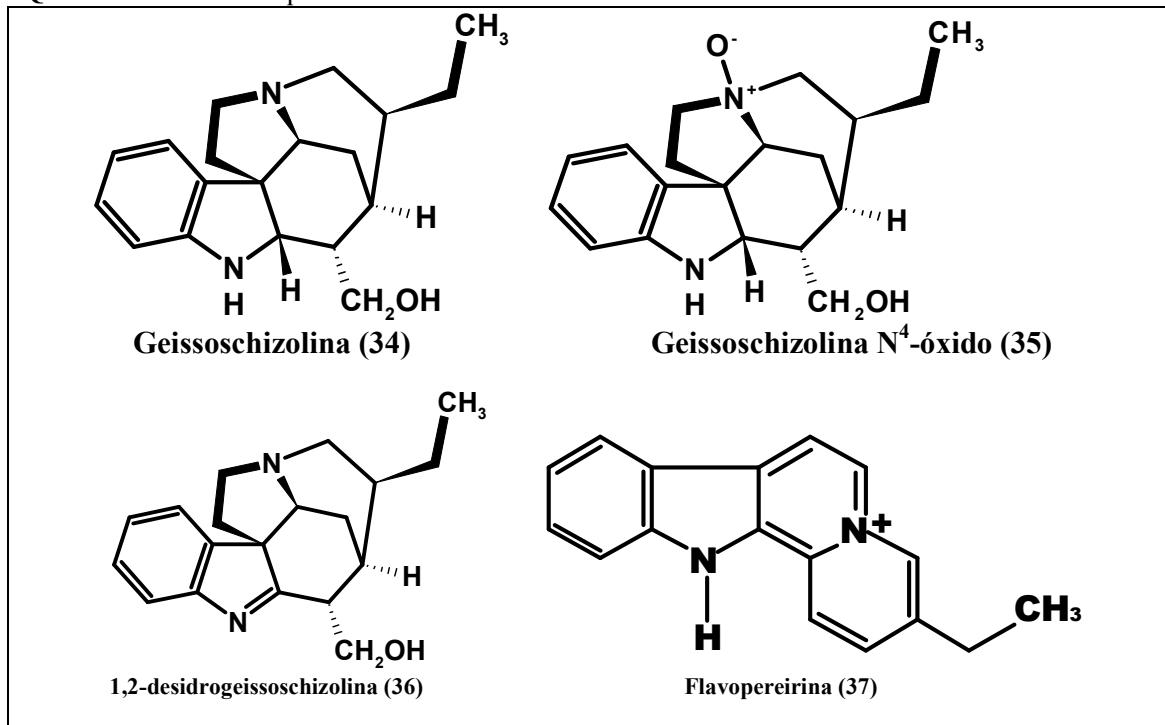
Aspidospermina (33): R = H, R₁= H, R₂= H

Fonte: MITAINE-OFFER *et al.*, 2002.

Outro gênero pertencente à família Apocynaceae, que também apresentou atividade antiplasmódica, é o *Geissospermum*. De *G. sericeum* (Sagot) Benth. & Hoolp.f. foram obtidos três alcalóides indólicos, geissoschizolina (34), geissoschizolina N⁴-óxido (35) e 1,2-desidrogeissoschizolina (36), além de um alcalóide β-carbolínico, a flavopereirina (37) (Quadro 8). O extrato hidroetanólico das cascas e os alcalóides isolados foram avaliados *in vitro* contra cepas K1 e T9-96 de *P. falciparum*. Das substâncias testadas, a flavopereirina (37) foi a mais ativa apresentando CI_{50} de 11,53 e 1,83 μM , respectivamente. Porém quando comparada a cloroquina (CI_{50} 0,32 e 0,03 μM), a flavopereirina mostrou atividade antiplasmódica inferior. A flavopereirina (37) mostrou-se, também, mais citotóxica dentre as quatro substâncias, quando avaliada em cultura de células KB ($CI_{50}= 10,7 \mu M$), sendo

mais citotóxica que a cloroquina ($IC_{50}=20,4 \mu M$) (Quadro 8, pg. 42) (STEELE *et al.*, 2002). Espécies de *Geissospermum* são utilizadas popularmente no tratamento da malária no Brasil (MILLIKEN, 1997).

Quadro 8: Estruturas químicas de alcalóides isolados de *G. sericeum*.



Fonte: STEELE *et al.*, 2002

Considerando a disponibilidade de material vegetal para realização deste trabalho, as seguintes espécies de *Aspidosperma* foram coletadas e sua atividade antiplasmódica avaliadas: *A. cylindrocarpum*; *A. olivaceum*; *A. parvifolium*; *A. ramiflorum*; *A. spruceanum* e *A. tomentosum*. Neste capítulo serão descritos os aspectos botânicos, químicos e biológicos destas espécies.

3.1.4- Revisão de literatura sobre as espécies de *Aspidosperma* avaliadas no presente trabalho: descrição botânica, atividades biológicas e alcalóides

3.1.4.1- *Aspidosperma parvifolium*

É conhecida, popularmente, como guatambu, peroba ou pau-pereira. Em termos botânicos, esta espécie se caracteriza por possuir folhas glabras, membranáceas, de coloração prateada na parte inferior, de 5-10 cm de comprimento. A árvore possui 10-15 m de altura, com o tronco de 40-60 cm de diâmetro. Produz, anualmente, grande quantidade de sementes que são amplamente disseminadas pelo vento. Floresce no final do mês de agosto com surgimento da nova folhagem. O desenvolvimento da planta no campo é rápido, podendo atingir 3,5-4,0 m aos 2 anos (LORENZI, 1992). Na Figura 5 (pg.45) têm-se a foto da árvore, de suas flores, frutos, sementes, casca e madeira.

A madeira de seu tronco é dura e resistente, sendo utilizada na construção civil como vigas e tacos para assoalhos. A árvore também é utilizada para fins ornamentais em paisagismo (LORENZI, 1992).

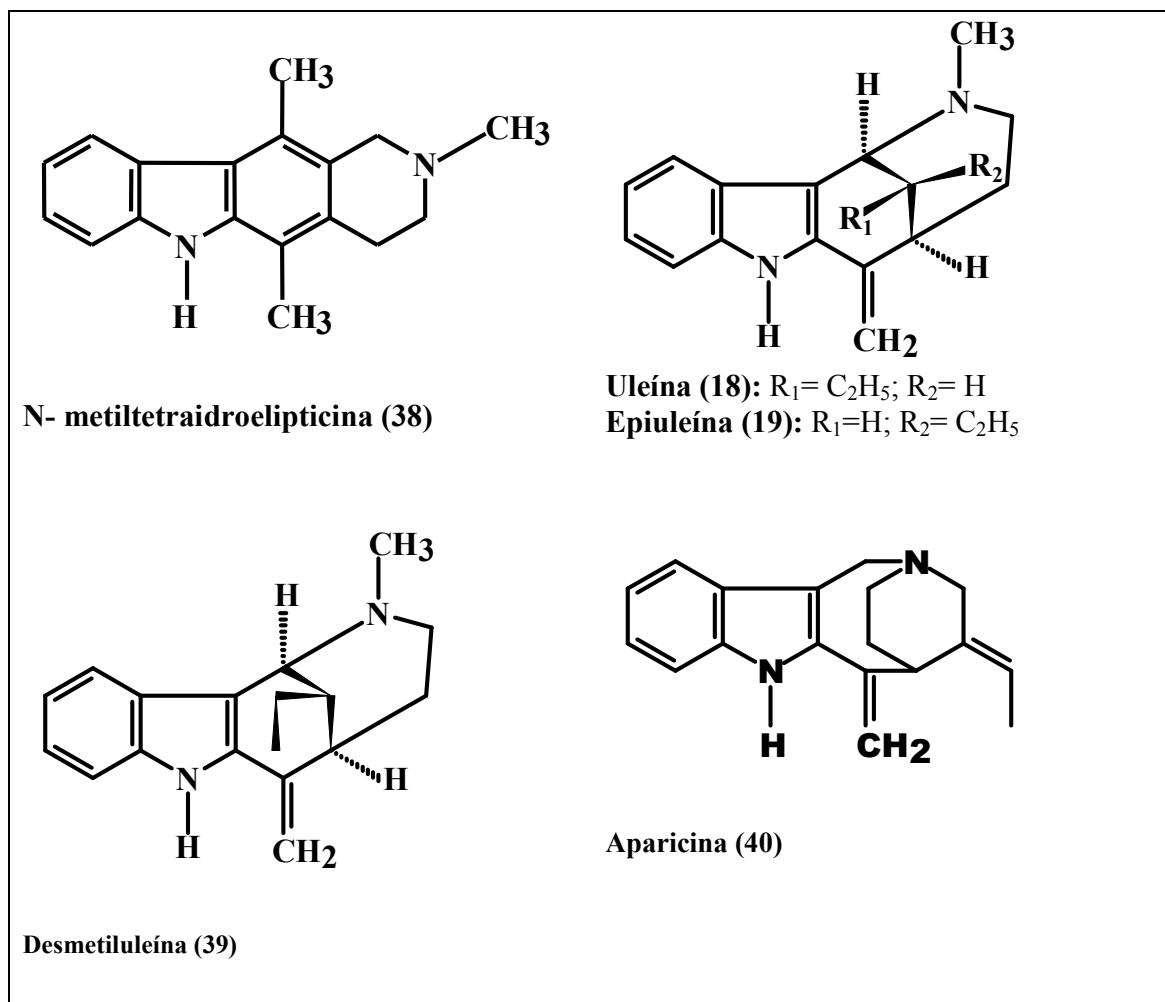
Do extrato etanólico de cascas de *A. parvifolium* foram isolados os alcalóides N-metiltetraidroelipticina (38) (BRUNELL e CASA, 1967), uleína (18), epiuleína (19), aparicina (39), desmetiluleína (40), além de um triterpeno, o lupeol (41), e um esteróide, o estigmasterol (42) (JÁCOME *et al.*, 2004). A uleína (18) já foi obtida de outras espécies de *Aspidosperma*, como *A. olivaceum* (GILBERT *et al.*, 1965) e *A. tomentosum* (ARNDT *et al.*, 1967). Os alcalóides isolados de *A. parvifolium* encontram-se listados na Tabela 1 (pg. 61) e suas estruturas são mostradas no Quadro 9 (pg.44).

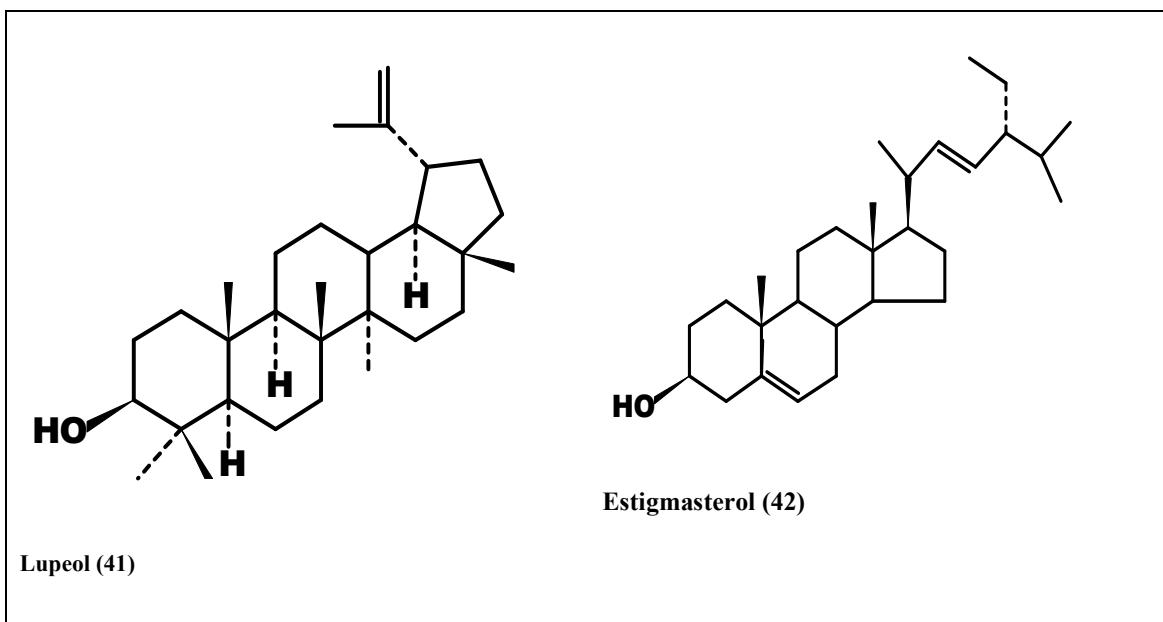
O extrato etanólico de cascas de *A. parvifolium* avaliado quanto à letalidade em *Artemia salina* e inibição de calos, induzidos por *Agrobacterium tumefaciens*, em discos de batatas, demonstrou um elevado potencial antitumoral, isto é, a concentração letal 50% (CL₅₀) foi 103,8 µg/ml para a *Artemia salina* e, nesta concentração, houve inibição de 94,4% da formação dos calos em discos de batata. Este extrato apresentou, também, atividade anti-*Trypanosoma cruzi* (DOLABELA, 1997). A toxicidade observada em *Artemia salina*, provavelmente está relacionada à presença de alcalóides indólicos.

Uma mistura de alcalóides indólicos, contendo predominantemente a uleína (18) (53%) reduziu a secreção ácida no estômago de roedores, e esta redução pode estar relacionada ao bloqueio da bomba H⁺,K⁺-ATPase (BAGGIO *et al.*, 2005). Outro alcalóide indólico,

presente em *A. parvifolium*, a aparicina (39), foi submetido ao ensaio para atividade antifúngica, porém não foi observada inibição do crescimento do microorganismo (HERNANDEZ e PEREZ, 1977).

Quadro 9: Estruturas químicas das substâncias isoladas de *A. parvifolium*.





Fonte: JÁCOME *et al.*, 2004

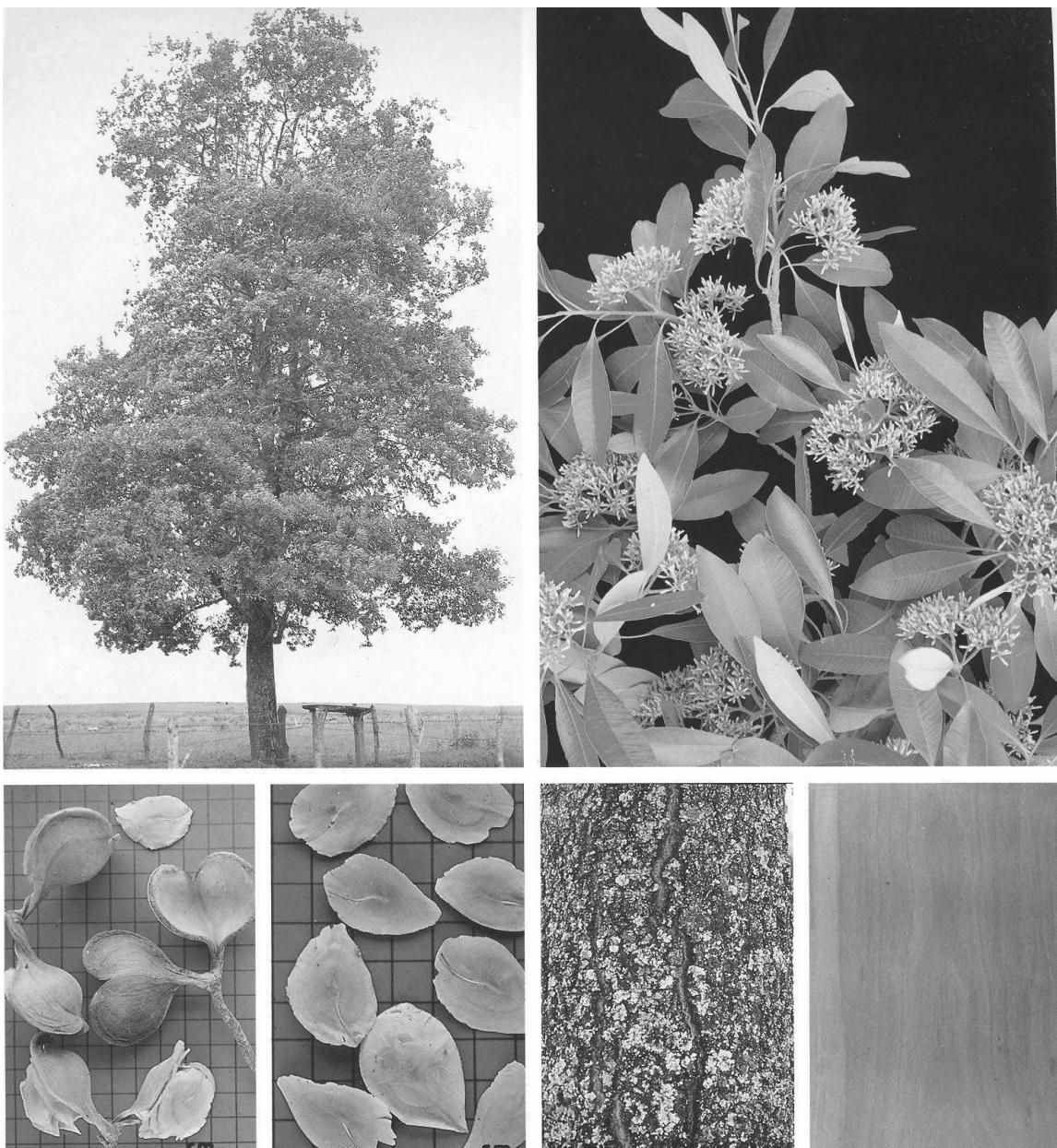


Figura 5: *Aspidosperma parvifolium*: árvore, inflorescência, frutos, sementes, casca e madeira.
Fonte: LORENZI, 1992.

3.1.4.2- *Aspidosperma cylindrocarpon*

Aspidosperma cylindrocarpon ocorre nos Estados de São Paulo, Mato Grosso, Goiás Minas Gerais onde é conhecida como peroba-iquira, peroba-de-Lagoa-Santa, peroba-de-Minas e peroba-rosa. Esta planta apresenta de 4 a 12 m de altura, ramos relativamente delgados, folhas ovais e lanceoladas-elípticas, agudamente acuminadas a obtusas; inflorescência em panícula, subterminal na axila das folhas mais elevadas (CORRÊA,

1984). A Figura 6 (pg. 47) mostra a árvore, inflorescência, frutos, sementes, casca e madeira desta espécie.

A toxicidade dos extratos etanólicos de caules e folhas de *A. cylindrocarpon* foi avaliada em *Artemia salina* observando-se que, neste modelo, os extratos mostraram-se pouco tóxicos ($CI_{50} > 500 \mu\text{g/mL}$) (GARCIA, 2000). Não foram encontrados na literatura informações sobre os usos tradicionais e outras atividades biológicas de *A. cylindrocarpon*.

Os alcalóides isolados desta planta estão listados na Tabela 1 (pg. 61) e suas estruturas e de outras substâncias isoladas de *A cylindrocarpon* encontram-se no Quadro 10 (pg.48).

3.1.4.3- *Aspidosperma olivaceum*

É uma árvore grande e frondosa, com tronco de casca áspera e acinzentada; folhas longo-pencioladas, lanceoladas e espatuladas, agudas, na base estreitamento em pecíolo, ondulada nas margens, glabras ou com pêlos esparsos. As flores são pequenas, brancas, dispostas em cimeiras, alternando com os ramos (CORRÊA, 1984).

No Brasil, ocorre desde a Bahia até o Rio Grande do Sul, e é conhecida, popularmente, como gipio, guatambu-marfim (Paraná), pau-cetim, pequiá-amarelo (Bahia), pequiá-branco e pequiá-marfim. Na Argentina, é conhecida como *guatambu-amarillo* ou *guantambu-saiyu* (CORRÊA, 1984).

A. olivaceum não faz parte das 52 espécies consideradas por Woodson (1951), sendo aceitos como sinônima os nomes *A. pyricollum* Muell. Arg. *fide* Woodson, 1951 e *A. pyricollum* Muell. Arg. *fide* Zuloaga, F. (1996) (MOBOT, 2007).

Em relação à atividade anticâncer, a olivacina (59), um isômero natural da elipticina (17), mostrou-se ativa em várias linhagens de células tumorais (JAZTOLD-HOWORKO *et al.*, 1994) e a hidroxilação na posição 9 aumenta a afinidade da substância pelo DNA levando ao aumento da citotoxicidade e da atividade antitumoral (MALLONE *et al.*, 2000).

As substâncias isoladas de extratos obtidos de *A. olivaceum* encontram-se descritas na Tabela 1 (pg. 61) e suas estruturas no Quadro 11 (pg. 49).

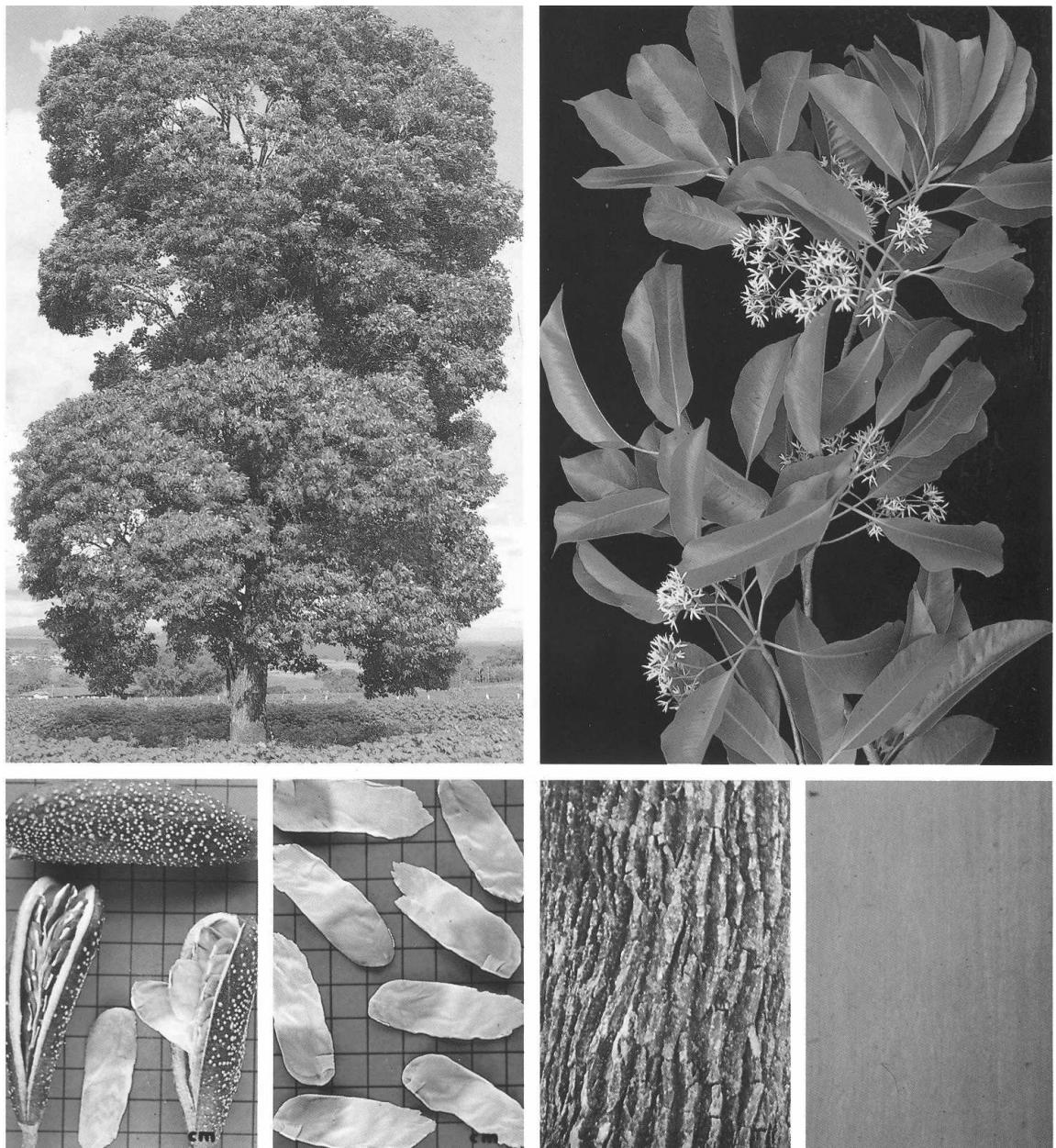
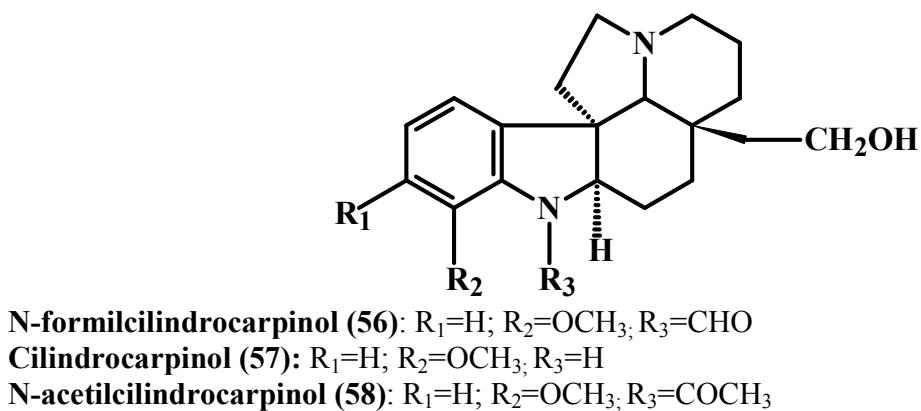
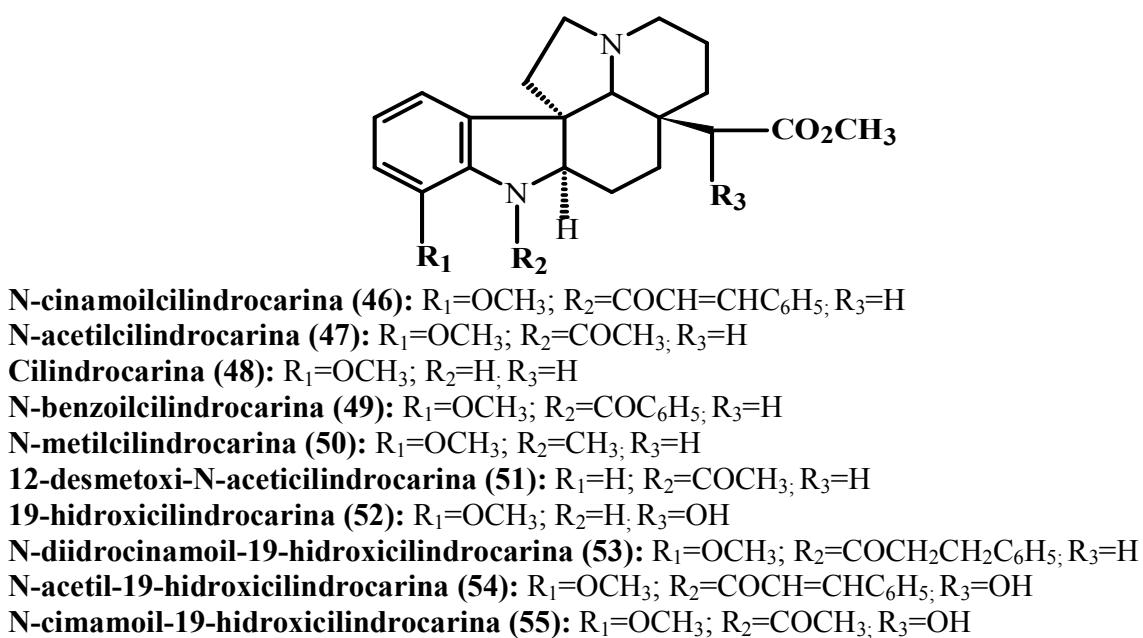
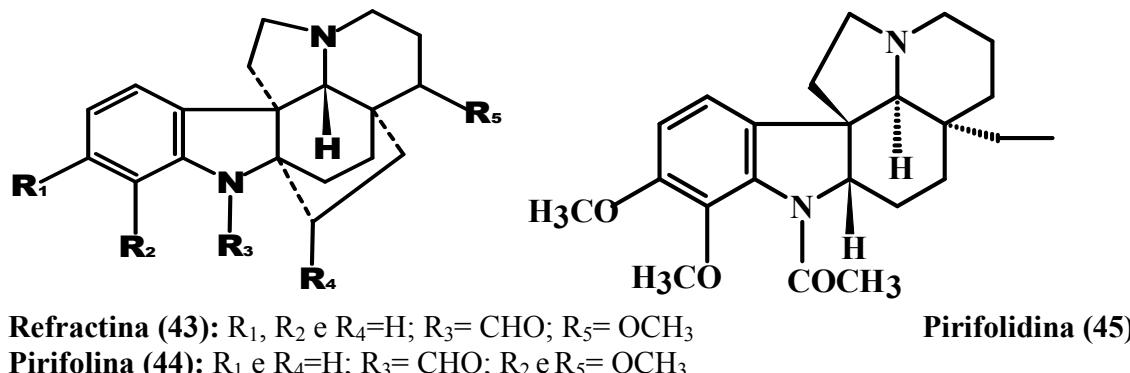


Figura 6: *A. cylindrocarpon*: árvore, inflorescência, frutos, sementes, casca e madeira.

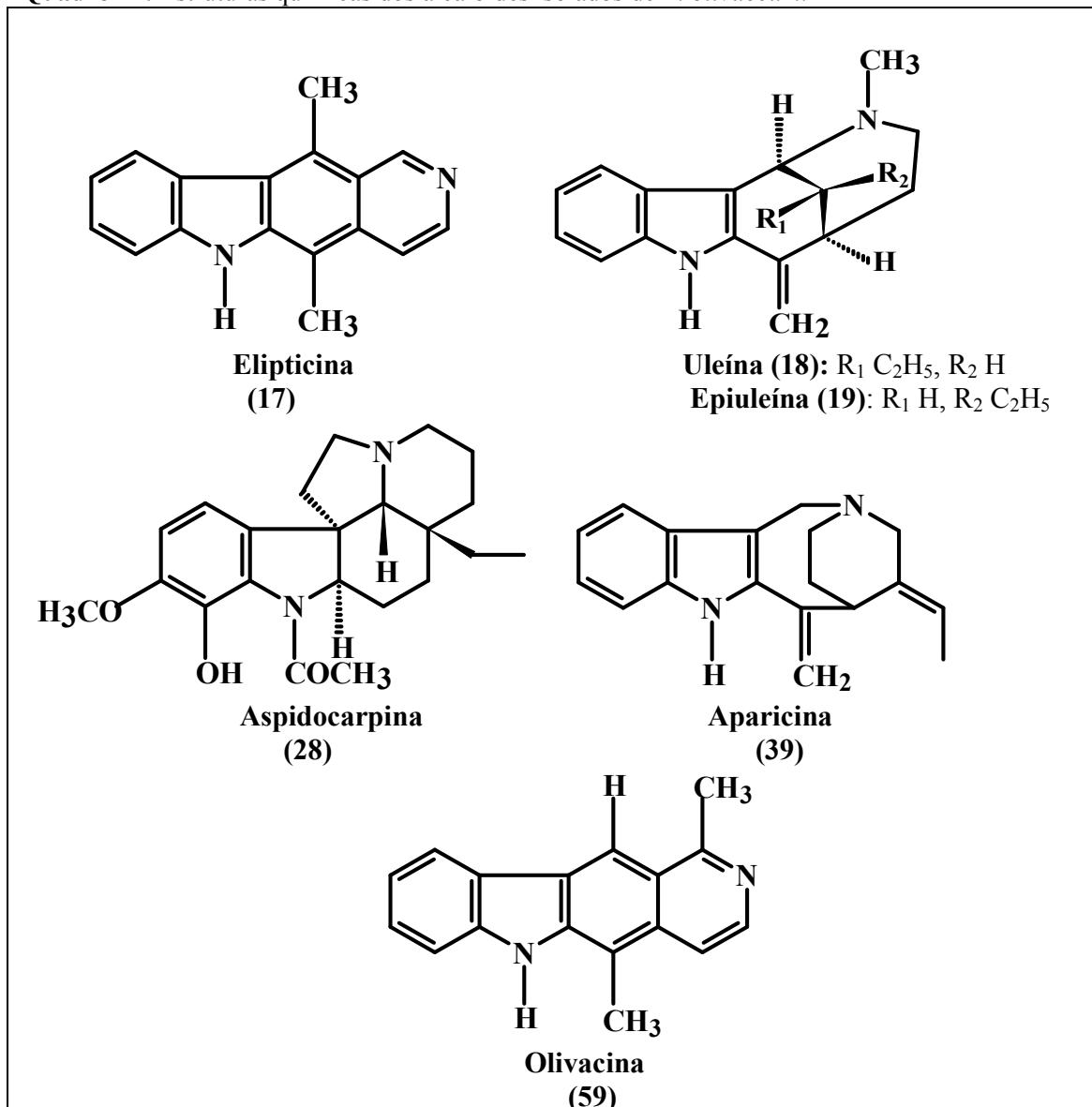
Fonte: LORENZI, 1992

Quadro 10: Estruturas químicas dos alcalóides isolados de *A. cylindrocarpon*.



Fonte: JÁCOME, 1998.

Quadro 11: Estruturas químicas dos alcalóides isolados de *A. olivaceum*.



Fonte: JÁCOME, 1998.

3.1.4.4- *Aspidosperma ramiflorum*

É uma árvore nativa da mata atlântica do sudeste brasileiro. Floresce, no estado do Rio de Janeiro, no período de junho a julho, sendo conhecida, popularmente, como pequiá-doce e tambú. Árvore grande, ramos lisos ou verrucosos, cinzento-escuros, folhas curto-pecioladas, elípticas, obtusas ou um pouco agudas nas extremidades, limbo de 7-9 cm de comprimento e de 30-40 mm de largura, escuras, saliente nervadas, com 8-10 nervuras secundárias de cada lado; flores curtíssima pediceladas, brancas, dispostas em cimeiras nos

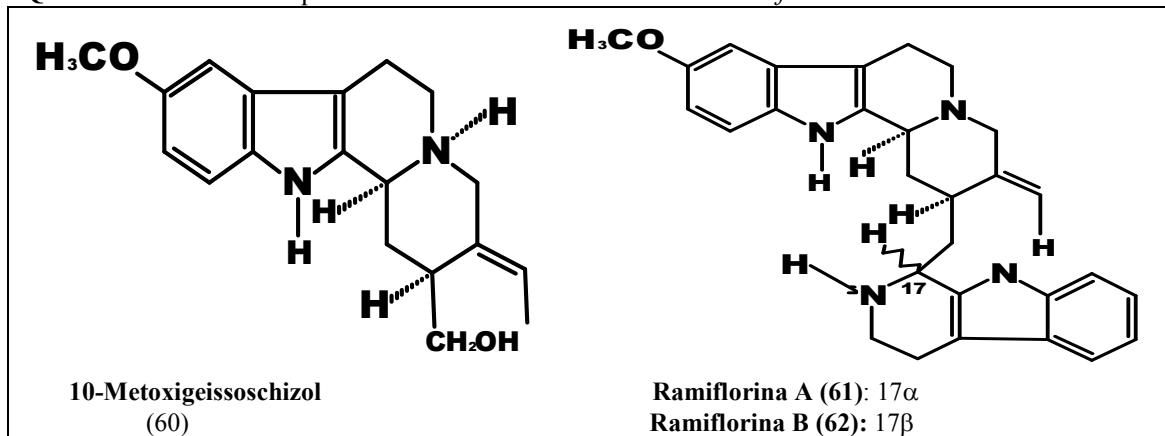
ramos laterais, brácteas ovado-lanceoladas, hirto-ferrigíneas, lacínias calicinais oblongo-ovadas e ovário-glabro (CORRÊA, 1984). Na Figura 7 (pg. 51) encontram-se as fotografias da árvore, inflorescências, sementes, casca e madeira de *A. ramiflorum*.

O extrato alcaloídico de cascas de *A. ramiflorum* foi ativo frente às formas promastigotas de *Leishmania* (L.) *amazonensis* e *L.* (V.) *brasiliensis*, sendo este mais efetivo na *L.* (L) *amazonensis* (FERREIRA *et al.*, 2004). Uma fração resultante da separação cromatográfica do extrato alcaloídico mostrou-se altamente ativa contra *B. subtilis* (CIM= 15,6 µg/mL) e *S. aureus* (CIM= 31,3 µg/mL) e inativa contra bactérias Gram negativas (TANAKA *et al.*, 2006). O fracionamento forneceu uma fração alcaloídica ativa contra *C. neoformans* (CIM< 15,6 µg/mL) e dermatófitos (CIM de 62,5-125) (SOUZA *et al.*, 2006).

O extrato metanólico das cascas de *A. ramiflorum* foi moderadamente ativo frente à *Bacillus subtilis* (CIM= 250 µg/mL), *Staphylococcus aureus* (CIM= 250 µg/mL) e inativo para *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (CIM > 1000 µg/mL) (TANAKA *et al.*, 2006). O extrato metanólico de *A. ramiflorum* também apresentou moderada atividade antifúngica, frente ao *Cryptococcus neoformans* (CIM de 62,5 - 250 µg/mL) e fraca atividade contra dermatófitos (CIM de 500 a 1000 µg/mL) (SOUZA *et al.*, 2006).

As substâncias isoladas de *A. ramiflorum* encontram-se listadas na Tabela 1 (pg. 61) e as estruturas químicas são mostradas no Quadro 12 (pg. 50).

Quadro 12: Estruturas químicas de alcaloides isolados de *A. ramiflorum*.



Fonte: JÁCOME, 1998.



Figura 7: *Aspidosperma ramiflorum*: árvore, inflorescência, frutos, sementes, casca e madeira.
Fonte: LORENZI, 1992.

3.1.4.5- *Aspidosperma spruceanum*

Conhecida, popularmente, como amargoso, peroba, araracanga, pau-amarelo, pequiá-marfim, quina-da-mata e guatambu, esta espécie ocorre desde a amazônia até os estados de São Paulo e Minas Gerais, sendo maior a sua freqüência nas matas de altitude da

Serra da Mantiqueira, em Minas Gerais. A árvore pode ter 5-20 m, dotada de copa arredondada, com ramos sem lenticelas e com pêlos diminutos dando uma aparência farinhenta. O tronco pode ter de 30-40 cm de diâmetro e ser revestido por uma grossa camada de cortiça. Folhas curto-pecioladas, coriáceas, discolores, de 6-10 cm de comprimento, com a fase superior glabra e a inferior densa pubérula, com pilosidade levemente ferruginosa. O fruto é deiscente, com 8 a 10 sementes (Figura 8, pg. 52) (LORENZI, 1992).

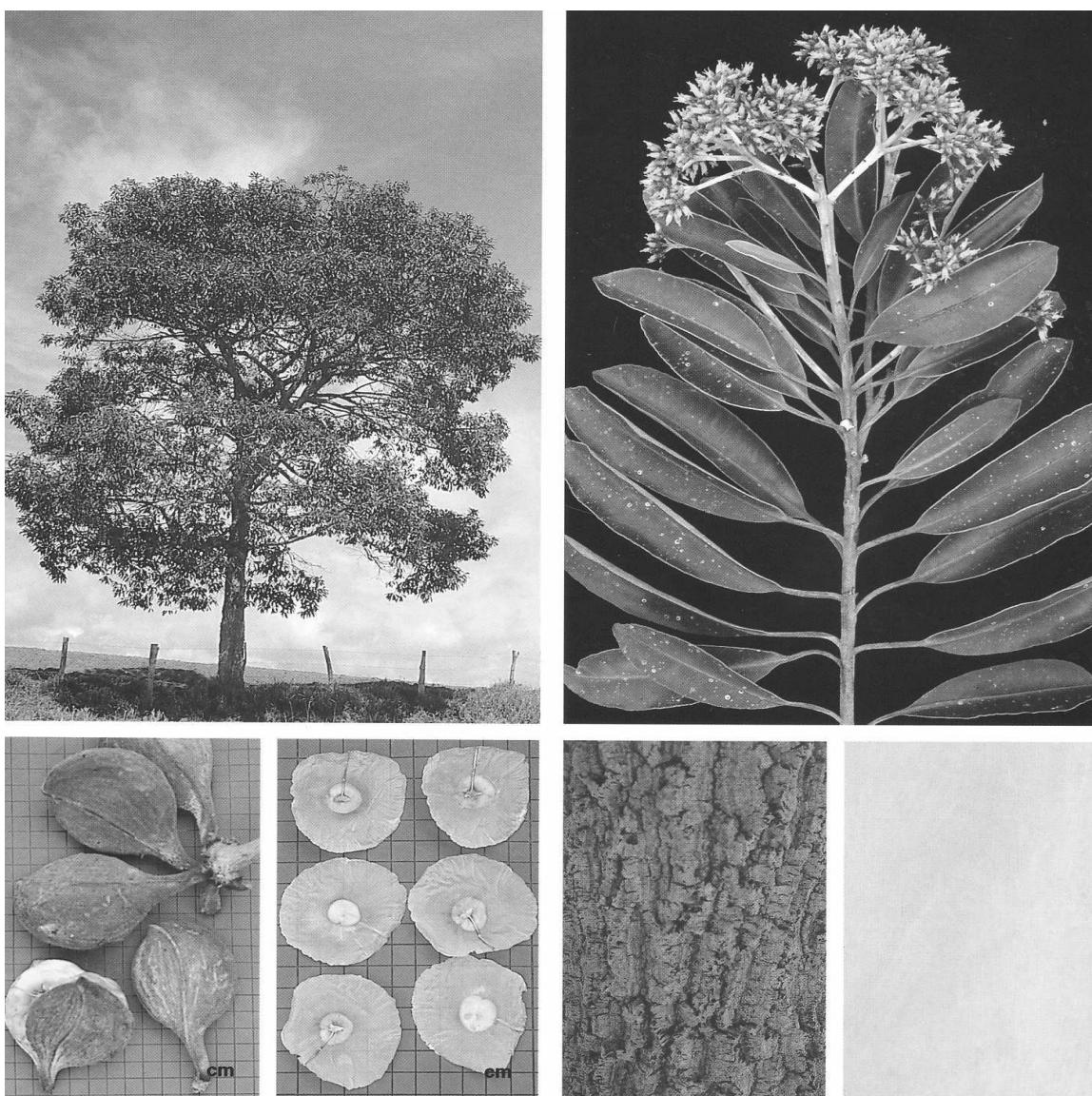
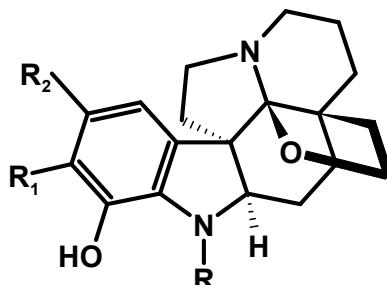


Figura 8: *Aspidosperma spruceanum*: árvore, inflorescência, frutos, sementes, casca e madeira.
Fonte: LORENZI, 1992.

Os alcalóides isolados de *A. spruceanum* estão listados na Tabela 1 (pg. 61) e suas estruturas químicas são mostradas no Quadro 13 (pg. 53).

Quadro 13: Estruturas químicas de alcalóides isolados de *A. spruceanum*.



Aspidoalbina (63): R = C₂H₅CO, R₁ = OCH₃, R₂ = OCH₃

Acetilaspidoalbina (64): R = CH₃CO, R₁ = OCH₃, R₂ = H

Desmetilaspidoslimidina (65): R = C₂H₅CO, R₁ = OCH₃, R₂ = OH

Fonte: JÁCOME, 1998.

3.1.4.6- *Aspidosperma tomentosum*

É conhecida, popularmente, por peroba-do-campo, peroba-do-cerrado, pau-pereira-do-campo, taroba e pau-pereiro-do-campo. Ocorre nos estados do Piauí, Bahia, Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Tocantins e São Paulo. Também é encontrada no Paraguai e Bolívia (LORENZI, 1992).

Esta planta lactescente, de 5-8 m de altura, com ramos grossos, tronco tortuoso com 20-30 cm de diâmetro, com casca grossa e corticosa. Folhas quase sésseis, quando novas densamente alvo-tomentosas, de 9-26 cm de comprimento por 4-10 cm de largura. Esta planta possui flores pequenas, branco-tomentosas e muito perfumadas, reunidas em cimeiras terminais. O fruto é semi-lenhoso, deiscente, contendo 4-8 sementes (Figura 9, pg.54) (LORENZI, 1992).

O extrato etanólico do caule de *A. tomentosum* mostrou-se ativo em ensaios *in vitro* com a forma tripomastigota do *Trypanossoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas. Da fração alcaloídica, isolou-se a uleína (18) que eliminou completamente o parasito do sangue na concentração de 0,31 mg/mL (ABREU e SILVA *et al.*, 2002).

Utilizando-se o modelo de *Artemia salina*, avaliou-se a toxicidade dos extratos brutos obtidos de caules, frutos e folhas de *A. tomentosum*, observando-se que, neste modelo, os extratos mostraram-se pouco tóxicos ($CI_{50} > 500 \mu\text{g/mL}$) (GARCIA, 2000).

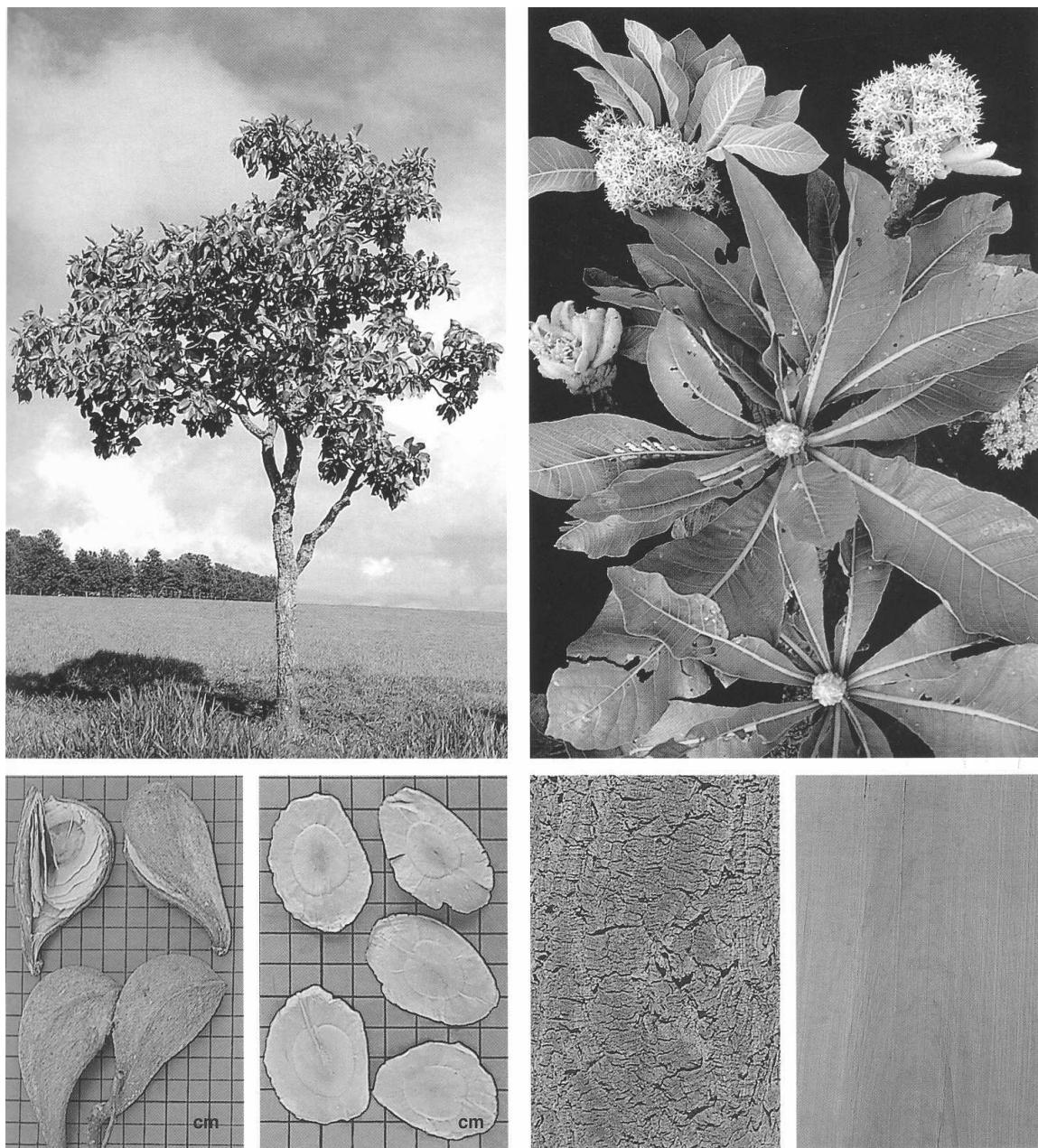
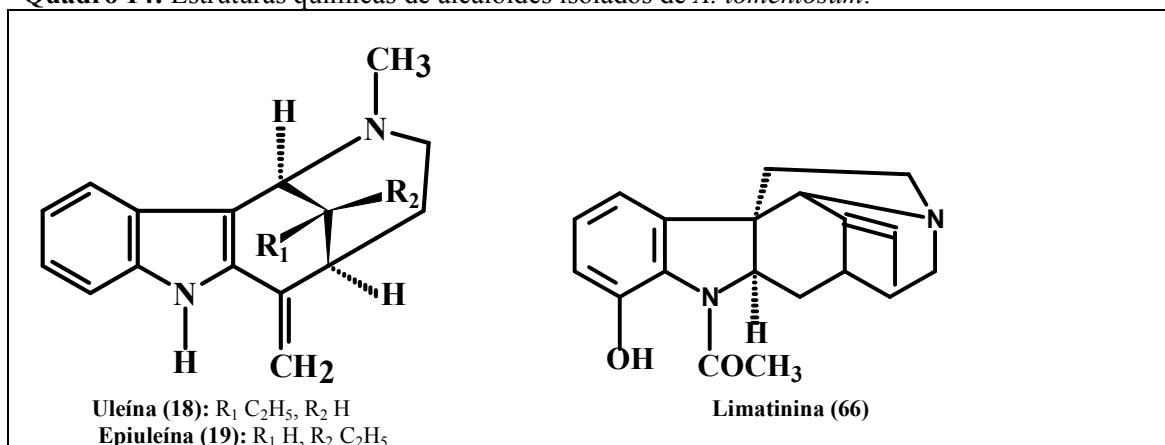


Figura 9: *Aspidosperma tomentosum*: árvore, inflorescências, frutos, sementes, casca e madeira.
Fonte: LORENZI, 1992.

Os alcalóides isolados de *A. tomentosum* estão listados na Tabela 1 (pg. 61) e suas estruturas são mostradas no Quadro 14 (pg. 54).

Quadro 14: Estruturas químicas de alcalóides isolados de *A. tomentosum*.



Fonte: JACOME, 1998.

3.2- *Esenbeckia febrífuga*: posição taxonômica, fitoquímica, etnofarmacologia e atividades biológicas

Pertence a família Rutaceae Juss. que está distribuída em regiões tropicais, subtropicais e temperadas do mundo, sendo constituída por 1600 espécies. No Brasil, ocorrem 182 espécies pertencentes a 29 gêneros (BARROSO *et al.*, 1986), entre as quais têm-se os gêneros *Zanthoxylum* L. e *Esenbeckia* Kunth. (MELO e ZICKEL, 2004).

Esenbeckia é um dos quatro gêneros que formam a subtribo Pilocarpinae, tribo Galipeae (anteriormente Cusparieae), subfamília Rutoideae e família Rutaceae. A monografia desta subtribo foi descrita na “Flora Neotropica by Kaastra”, em 1982, e contém catalogadas vinte e seis espécies pertencentes a este gênero. Trabalho mais recente, relata a existência de mais duas espécies presentes no Brasil e adjacências da Bolívia (PIRANI, 1999).

Em termos fitoquímicos, este gênero se caracteriza pela presença de alcalóides quinolínicos, furanoquinolínicos e acridonas (DREYER *et al.*, 1980; GUILHON *et al.*, 1994; OLIVEIRA *et al.*, 1996 e SIMPSOM e JACOBS, 2005); cumarinas e furanocumarinas (DREYER *et al.*, 1980; GUILHON *et al.*, 1994; OLIVEIRA *et al.*, 1996; TRANI *et al.*, 1997; RIOS e DELGADO, 2002 e SIMPSOM e JACOBS, 2005);

flavonóides (KUBO, 1991); limonóides (OLIVEIRA *et al.*, 1996); derivados do ácido cinâmico (GUILHON *et al.*, 1994) e triterpenos (RIOS e DELGADO, 1992). Na Tabela 2 (pg. 62) consta à relação das substâncias isoladas de espécies pertencentes a este gênero, e no Quadro 15 (pg. 58) são mostradas as estruturas químicas de representantes dos diversos tipos estruturais.

Em termos de uso como planta medicinal, muito pouca informação consta na literatura sobre o gênero *Esenbeckia*. *E. yaxhoob* Lundell é utilizada pela população de Yucatán (Península de Yucatán, México) para o tratamento de doenças do trato gastrintestinal (MATA *et al.*, 1998).

Esenbeckia febrifuga, conhecida popularmente como três-folhas-vermelhas, quinado-mato e laranjeira-do-mato (CARVALHO *et al.*, 1991; MELO e ZICKEL, 2004), pode ser encontrada na Argentina, Paraguai e Brasil, ocorrendo nos estados do Ceará, Mato Grosso, Paraná, Rio de Janeiro, São Paulo e Pernambuco (Agreste) (MELO e ZICKEL, 2004). Em geral, esta planta é encontrada em florestas semidecíduas da bacia do Paraná e na parte elevada da floresta atlântica, mas com baixa ocorrência em floresta de restinga (LORENZI, 1992). Na figura 10 (pg. 57) encontram-se fotografias da árvore, folhas, frutos, sementes, cascas e madeira de *E. febrifuga*.

Em termos de composição química e atividade farmacológica existem, relativamente, poucas informações sobre *E. febrifuga*. Desta planta foi isolado o aurapteno (99), que se mostrou ativo na inibição do crescimento de formas promastigotas de culturas axênicas de *Leishmania major* (NAPOLITANO *et al.*, 2004).

Carvalho e cols. (1991) demonstraram, em ensaios *in vivo*, em camundongos infectados com *P. berghei*, que o extrato aquoso de casca/talo desta planta, na dose de 1,0 g/kg, inibiu em 43% a multiplicação do parasito.

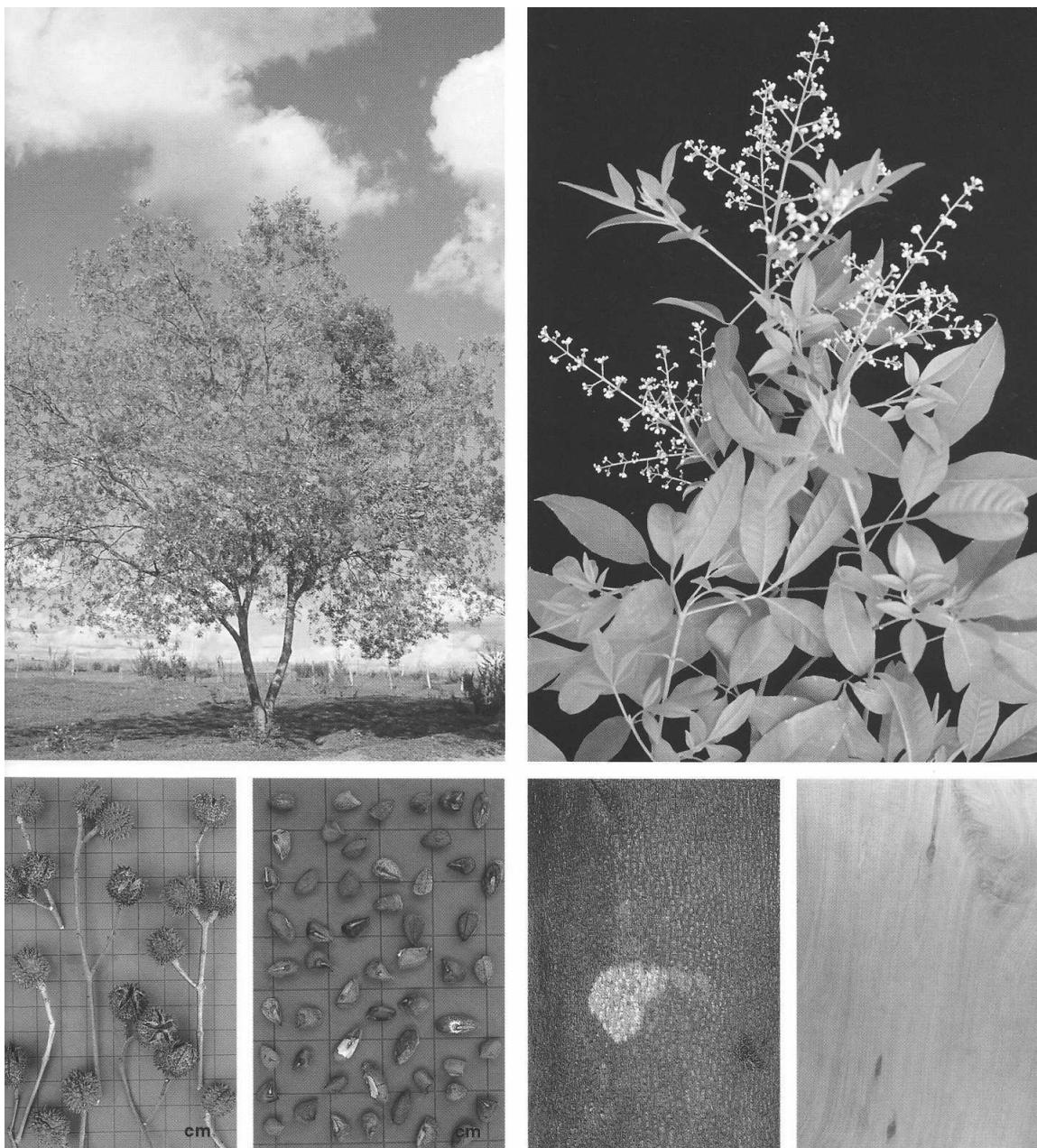
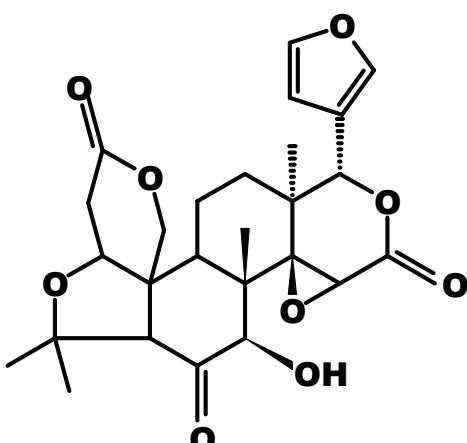


Figura 10: *Esenbeckia febrifuga*: árvore, inflorescências, frutos, sementes, casca e madeira.
Fonte: LORENZI, 1992.

De extratos obtidos de diferentes espécies pertencentes ao gênero *Esenbeckia* já foram isoladas várias substâncias que estão relacionadas na Tabela 2 (pg. 62) e algumas estruturas químicas são mostradas no Quadro 15 (pg. 58).

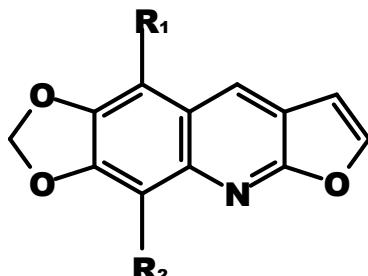
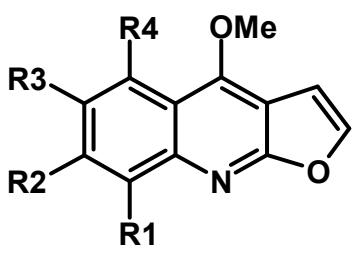
Quadro15: Estruturas químicas de substâncias isoladas de espécies pertencentes ao gênero *Esenbeckia*.

1- Limonóides



Limonina (67)

2- Furanoquinolinas



Kokusaginina (68): R₁ = R₄ = H; R₂ = R₃ = OCH₃

Dictamina (69): R₁ = R₂ = R₃ = R₄ = H

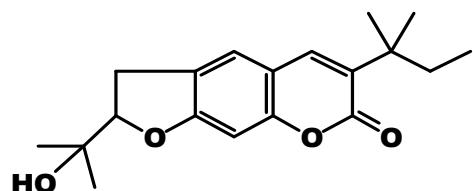
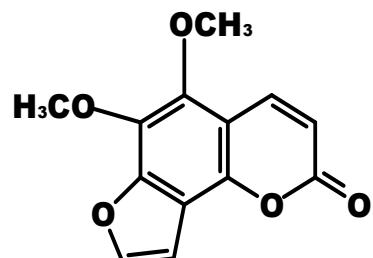
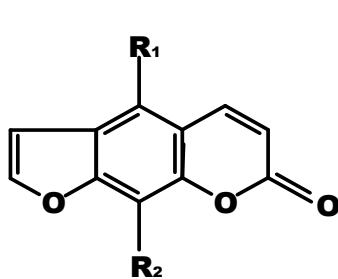
Skimmiamina (70): R₁ = R₂ = OCH₃; R₃ = R₄ = H

γ-Fagarina (71): R₁ = OCH₃; R₂ = R₃ = R₄ = H

Maculina (72): R₁=R₂=H

Flindersiamina (73): R₁=H; R₂ -OCH₃

3- Furanocumarinas



Bergapteno (74): R=OCH₃, R''= H

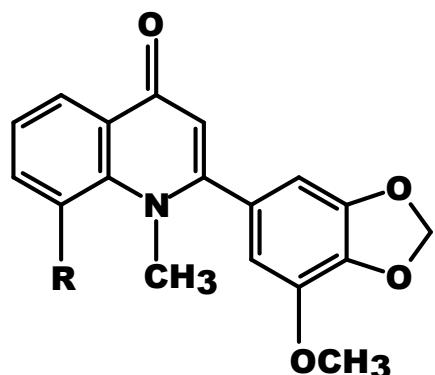
8-Hidroxibergapteno (75): R= OCH₃, R''=OH

Isopimpinelina (76): R=R''= OCH₃

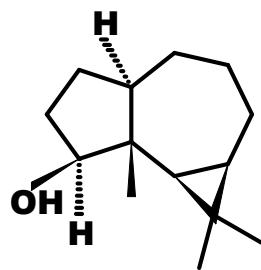
Xantoxina (77): R=H; R''= OCH₃

Pimpinelina
(78)

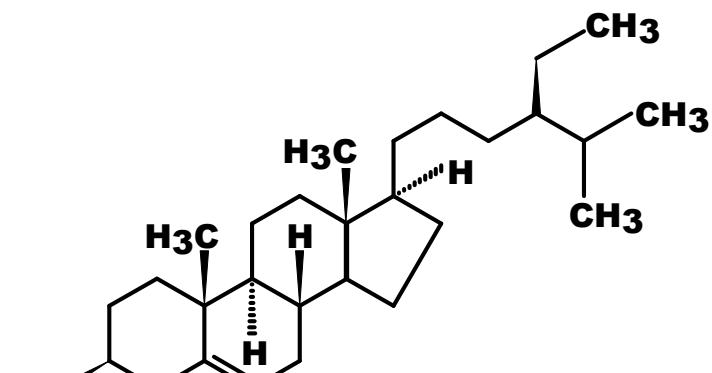
Chalepina
(79)

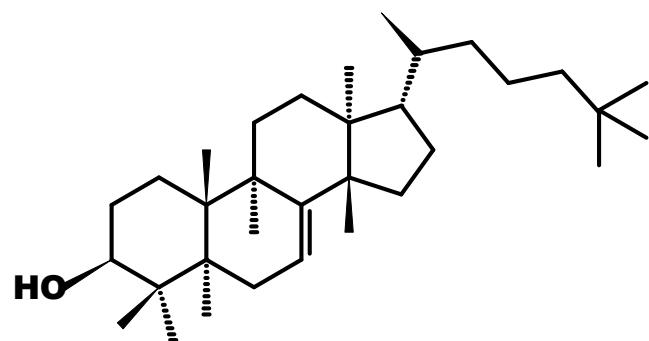
Quadro 15: Continuação**4- 2- Arilquinolonas**

(80) R=H

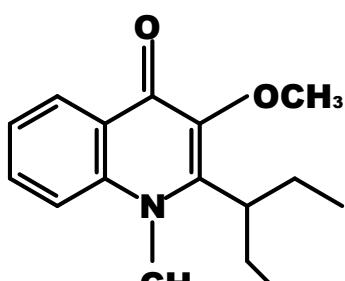
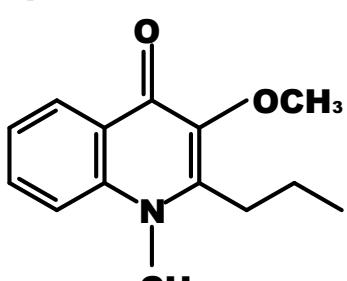
(81) R=OCH₃**5- Sesquiterpenos**

Epatulenol (82)

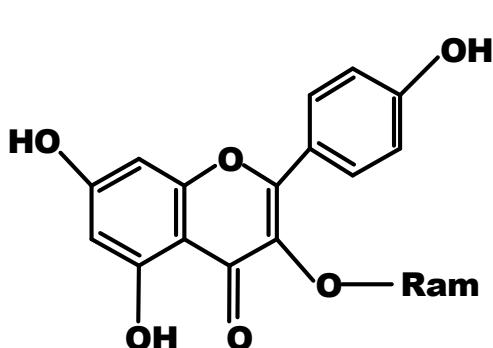
6- Esteróides**Triterpeno** β - sitosterol (83)



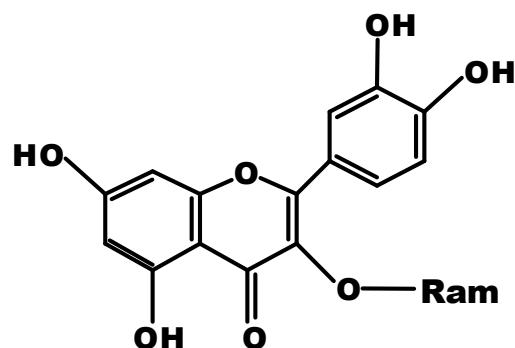
7- 2-Aquilquinolonas



8- Flavonóides



Kampferol-3-O-ramnosídeo (87)



Quercetina-3-O-ramnosídeo (88)

Fonte: OLIVEIRA, 1995.

Tabela 1: Substâncias isoladas de espécies pertencentes ao gênero *Aspidosperma*.

Espécies	Substância isolada (número da estrutura química)	Referências
<i>A. cylindrocarpon</i>	Refractina (43); pirifolina (44); pirifolidina (45), N-cinamoilcilindrocarina (46); N-acetilcilindrocarina (47); cilindrocarina (48); N-benzoilcilindrocarina (49); N-metilcilindrocarina (50); 12-desmetoxi-N-aceticilindrocarina (51); 19-hidroxicilindrocarina (52); N-diidrocinamoil-19-hidroxicilindrocarina (53); N-acetil-19-hidroxicilindrocarina (54); N-cimamoil-19-hidroxicilindrocarina (55); N-formilcilindrocarpinol (56); cilindrocarpinol (57) e N-acetilcilindrocaspino (58).	GILBERT <i>et al.</i> , 1960; ANTONACCIO, 1960; DJERASSI <i>et al.</i> , 1961; DJERASSI <i>et al.</i> , 1962 e BOLZANI <i>et al.</i> , 1987.
<i>A. olivaceum</i>	Elipticina (17); uleína (18); epiuleína (19); aparicina (39); aspidocarpina (28) e olivacina (59).	GILBERT <i>et al.</i> , 1965.
<i>A. parvifolium</i>	N- metiltetraidroelipticina (38); uleína (18); epiuleína (19); desmetileléina (40); aparicina (39); lupeol (41) e estiigmasterol (42).	JÁCOME, 1998 e JÁCOME <i>et al.</i> , 2004
<i>A. ramiflorum</i>	Ramiflorina A (61); ramiflorina B (62); β -yoimbina (31) e 10-metoxigeissoschizol (60).	MARQUES <i>et al.</i> , 1996
<i>A. spruceanum</i>	Aspidoalbina (63); acetilaspidoalbina (64) e desmetilaspidolimidina (65).	GILBERT <i>et al.</i> , 1965
<i>A. tomentosum</i>	Uleína (18); epiuleína (19) e limatinina (66).	ARNDT <i>et al.</i> , 1967

Tabela 2: Substâncias isoladas de espécies pertencentes ao gênero *Esenbeckia*

Espécies	Substâncias isoladas	Referências
<i>E. almwillia</i> Kaastra	2-Alquilquinolin-4-onalcalóide; isopimpinelina; chalepina; flindersiamina e maculosidina.	GUILHON <i>et al.</i> , 1994; OLIVEIRA <i>et al.</i> , 1996 e BARROS FILHO <i>et al.</i> , 2004
<i>E. conspecta</i> Kunth	β -Sitosterol; ácido oleico; ácido palmítico; espatulenol; clovandiol; felopterina; 8-metoxi-N-metilflindersina; flindersiamina; maculosidina e glicosídeo de β -sitosterol.	RIOS <i>et al.</i> , 2002
<i>E. febrifuga</i> (A.St-Hil.)	Aurapteno	NAPOLITANO <i>et al.</i> , 2004
<i>E. grandiflora</i> Matius	Kokusaginina; maculina; flindersiamina; xantotoxina e pimpinelina.	OLIVEIRA <i>et al.</i> , 1996
<i>E. grandiflora</i> Martius subsp <i>brevipetiolata</i> Kaastra	Pimpinelina; isopimpinelina; xantoxina; 5-senecioil-xantotoxina; 3-(1',1'-dimetilalil)-columbianetina; kokusaginina; flindersiamina; γ -fagarina; skimiamina; delbina; diidrochalconas M-1 e M-2; kampferol-3-O-ramnosídeo e quercitin-3-O-ramnosídeo.	TRANI <i>et al.</i> , 2004
<i>E. litoralis</i> Kunth	Rutaevina; limonina; bergapteno; 8-hidroxibergapteno; isopimpinelina; kukosaginina; imperatorina; felopterina; alomimperatorina; 1-hidroxi-3-metoxi-N-metilacridona; dictamina; evolitrina; maculina e skimmianina.	DREYER, 1980
<i>E. ovata</i> Kunth	Friedelina; lupenona; cariofileno β -óxido; lupeol; β -sitosterol; bergapteno; isopimpinelina; xantotoxina; felopterina e criptomeridiol.	RIOS e DELGADO, 2002
<i>E. stenophani</i> Ramos	β -Sitosterol; cariofileno- β -óxido; friedelina e valenol.	RIOS e AGUILAR-GUADARRAMA, 2000
<i>E. yaxhoob</i> Lindell	2-Tridecanona	MATA <i>et al.</i> , 1998
<i>E. yaaxhokob</i>	Flindersiamina e espatulenol.	AGUILAR-GUADARRAMA e RIOS, 2004

4- MATERIAL

4.1- Equipamentos

- Estufa com circulação de ar Fanem, modelo 315/9
- Moinho de facas Marconi, modelo 6294
- Evaporador rotatório Buchi, modelo R 114, com banho-maria modelo 480
- Ultra-som Thornton, modelo T14
- Banho- maria Procimed, modelo 129/4
- Centrifuga Fanem, modelo 205-N
- Aparelho de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência MercK-Hitachi constituído de injetor automático (AS-2500), detector UV-VIS L450, bomba L-6200 A., integrador AS-2500 e coluna para CLAE ODS C-18 Lichropher (250 x 4,0 mm i.d.), 5mm, Merck 50983
- Aparelho de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência WATERS 2695, equipado com detector WATERS 2996- Photodiode Array Detector
- Sistema de purificação de água Millipore, Milli-Qplus
- Destilador de água Biopar Ltda, modelo: BD 5L
- Lâmpada de luz ultravioleta Spectroline, modelo ENF-240C
- Lâmpada de luz ultravioleta Spectroline, modelo 977C
- Balança analítica Mettler Toledo, modelo AB 204, precisão de 0,1mg
- Balança de prato externo Micronal, modelo B-160, precisão de 1mg
- Balança de prato externo Núcleo, modelo PR1000, precisão de 10mg
- Fluxo Laminar Veco
- Beta-cintilador 1450, Wallac, Trilux, Liquid Scintillation & Luminescence Counter
- Coletor de células Harvester 96, Mach III
 - Leitor de Elisa Bio- Rad, model 550, microplate reader

- Shaker Innova 2100
- Microscópio Axiostar Zeiss

4.2- Solventes e Reagentes

- Água destilada
- Água deionizada
- Etanol grau comercial
- Solventes P.A (Merck, Aldrich e Reagen): acetato de etila, acetona, etanol, diclorometano, hexano, metanol
- Solvente grau CLAE (Merck): acetonitrila
- Ácido hexanosulfônico sal sódico Sigma
- Ácidos grau P.A. (Merck): ácido acético glacial, ácido 3,5-dinitrobenzóico, ácido sulfúrico, ácido clorídrico e ácido fosfórico.
- Hidróxido de amônio P.A. (Merck)
- Substâncias de Referência: rutina; uleína, ácido ursólico; eugenol, obtidos no laboratório de Fitoquímica; saponina (Riedel de Haen, Seelze-Honnover).
- Cloroquina e Mefloquina (WHO *In vitro* Micro test, Plate, VCRV, USM, Malaysia)
- Ortofosfato dissódico anidro (Merck).
- Ortofosfato monobásico anidro (Merck).
- Azul de metíleno medicinal (Sigma).
- **4.3- Reagentes para revelação e fases estacionárias para CCDS:** anisaldeído (Merck); cloreto de alumínio (Fluka); subnitrito de bismuto (Farmos); iodeto de potássio (Merck); hidróxido de potássio (Reagem); difenilboriloxietilanina (Merck);

polietilenoglicol 4000= PEG (Merck); Sílica gel (60G Merck, artigo 7731); Sephadex LH-20 (Sigma), cromatofolhas de sílica gel 60 (20x20 cm), Merck.

4.4-Componentes do meio de cultura e de outras soluções utilizadas nos cultivos: dextrose (Merck); sulfato de gentamicina (Industria Química e Farmacêutica Schering); solução de Glicerol (Fenwal Laboratories); heparina (Roche Químicos e Farmacêuticos S.A.); HEPES- N-2-hidroxietil piperazina-N'-2-etano ácido sulfônico (Sigma); RPMI 1640 livre acido e sem hipoxantina (Gibco Laboratories); fosfato de sódio dibásico hepta-hidratado (Merck); fosfato de sódio dibásico dodeca-hidratado (Synth); fosfato de potássio monobásico (Merck); bicarbonato de sódio (Merck); iodeto de Potássio (Merck); meio MEM (Gibco Laboratories); Sal de tetrazolium- MTT (Sigma); [8-³H]-Hipoxantina 1mCi (Amersham Biosciences).

4.5- Material plástico- Placas com 96 poços; garrafas de 50 mL; garrafas de 250mL; placas Petri de 15 mL; tubos de 15mL e 50mL (Falcon).

4.6- Soluções especiais utilizadas neste trabalho

4.6.1- Soluções Reveladoras para Cromatografia em Camada Delgada de Sílica Gel

4.6.1.1- Reagente de Dragendorff (WAGNER *et al.*, 1984)

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

Estas duas soluções foram combinadas, na proporção de 1:1, resultando uma solução estoque. Para pulverização nas placas cromatográficas foi feita a diluição de 2,0 mL de solução estoque com 4,0mL de ácido acético glacial e 20,0 mL de água destilada.

Além deste reagente, visando intensificar a coloração das manchas alaranjadas provenientes da revelação com reagente de Dragendorff, as placas foram reveladas, também com solução metanólica de ácido sulfúrico a 5% (5,0 mL de ácido sulfúrico diluído em metanol q.s.p 100,0 mL).

4.6.1.2- Anisaldeído/ ácido sulfúrico (WAGNER *et al.*, 1984)

Dissolveram-se 5,5 mL de anisaldeído em 10 mL de ácido acético glacial, em seguida adicionou-se 85,0 mL de metanol e, por último, ácido sulfúrico concentrado (5,0 mL).

4.6.1.3- Reagente de Lieberman-Burchard (WAGNER *et al.*, 1984)

Em banho de gelo, adicionaram-se 5 mL de anidrido acético, 5 mL de ácido sulfúrico e 50 mL de etanol (P.A). As placas foram pulverizadas em seguida, aquecidas a 100° C por 5-10 min.

4.6.1.4- Solução de hidróxido de potássio 5% em etanol (WAGNER *et al.*, 1984)

Dissolveram-se hidróxido de potássio (5 g) em 100 mL de etanol. Esta solução foi pulverizada nas placas de CCDS e avaliaram-se as manchas no visível e sob luz UV 365 nm.

4.6.1.5- Solução de cloreto de alumínio a 10% em etanol (WAGNER *et al.*, 1984)

Dissolveram-se 10 g de cloreto de alumínio em etanol (q.s.p.100 mL). Esta solução foi pulverizada nas placas de CCDS e avaliaram-se as manchas no visível e sob luz UV 365 nm.

4.6.1.6- NP/PEG (WAGNER *et al.*, 1984)

Preparou-se uma solução metanólica a 1% de difenilboriloxietilamina (NP) e uma solução etanólica de polietileneglicol –4000 (PEG). No momento da utilização, misturou-se 10mL de NP com 8 mL de PEG, pulverizou-se as placas com esta solução e observou-se as manchas com lâmpada de UV 365 nm.

4.6. 2- Solução utilizada como fase móvel em CLAE

4.6.2.1- Tampão fosfato ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$)

Preparou-se uma solução 0,1 M de fosfato de sódio dibásico. O ajuste do pH para 2,6 e 5,0 foi feito utilizando o ácido fosfórico. A este tampão fosfato foi adicionado 2,5 mM de sal sódico de ácido hexanosulfônico.

4.6.3- Soluções utilizadas durante o cultivo do *P. falciparum*

4.6.3.1- Meios de cultivo: *Meio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) e meio completo*

Em 900,0 mL de água bidestilada dissolveu-se 10,4 g do pó de RPMI 1640. Adicionaram-se 5,94 g de tampão HEPES, 40 mg de gentamicina e completou-se o volume para 1000 mL com água bidestilada. Homogeneizou-se, filtrou-se em membrana esterilizante e estocou-se a 4º C (solução de uso imediato) e a 70º C negativos (solução de uso tardio).

O meio completo foi preparado adicionando-se plasma humano (grupo sangüíneo do tipo A+) à solução do meio RPMI (9:1). Para cada 100 mL de meio foi adicionado 2,1 mL solução de bicarbonato de sódio 10% (pH 7,2-7,4).

4.6.3.2- Soluções utilizadas no descongelamento do parasito

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

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

b- Solução B: cloreto de sódio a 1,6%

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

c- Solução C: cloreto de sódio glicosado

Dissolveram-se 0,9 g de cloreto de sódio e 0,2 g de glicose em água destilada (q.s.p. 100 mL). A solução foi filtrada em membrana de 0,22 μ e estocada a 4º C.

4.6.3.3- Solução utilizada na sincronização do parasito

Para a sincronização do parasito utilizou-se uma solução aquosa contendo 5% de sorbitol e 0,5% de glicose. Esta solução foi filtrada em membrana de 0,22 μ e estocada a 4º C.

4.7- Coloração de gota espessa e esfregaço

4.7.1- Solução estoque de Giemsa

Dissolveu-se 1 g de Giemsa em 54 mL de glicerol, resfriou-se, adicionou-se 84 mL de metanol e deixou-se por 24h a 37º C, com agitação. Filtrou-se e armazenou-se em vidro

âmbar. Esta solução foi diluída, na proporção 1:20 com água tamponada (50 µL/ 1000 µL), antes de sua utilização.

4.7.2- Água tamponada (pH 6,8)

A água tamponada continha 9,3 g de fosfato de potássio monobásico; 10,84 g de fosfato de sódio dibásico hepta-hidratado e água destilada (qsp. 500 mL). Homogeneizou-se, filtrou-se.

4.7.3- Azul de metíleno

Triturar 1,0g de azul de metíleno, 3,0g de ortofosfato dissódico anidro e 1,0g de ortofosfato monobásico anidro. Dissolver em 1,25mL de água bidestilada, homogeneizar e filtrar.

4.8-Material biológico

4.8.1- Clones de *P. falciparum*

Os clones W2 e 3d7 foram gentilmente cedidos pela Dra. Luzia Helena de Carvalho, Centro de Pesquisas René Rachou-CPRR, FIOCRUZ, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. O clone W2 é originário da Indochina e é sensível a mefloquina e resistente a cloroquina. O clone 3d7 é proveniente da África, sendo sensível a cloroquina.

4.8.2- Plasma humano

O plasma foi cedido pelo Banco de Sangue HEMOPA, Belém, PA. Os pacientes doadores eram pertencentes ao grupo sanguíneo A fator Rh positivo, sendo o sangue colhido com citrato de sódio e centrifugado a 500G por 20 minutos. O plasma sobrenadante foi isolado, aliquotado e conservado sob refrigeração.

4.8.3- Hemácias humanas

As hemácias foram colhidas de doador cujo sangue é do tipo O+. O sangue foi colhido assepticamente, armazenado em tubo contendo CPDA (Citrato Fosfato Dextrose

Adenosina) a 4°C por 30 dias. Semanalmente, uma alíquota deste sangue foi transferida para um tubo contendo heparina e centrifugado (600G/10min), sendo o plasma e a camada de leucócitos desprezados. Após duas lavagens com meio RPMI 1640, as hemárias foram re-suspensas em meio completo na proporção 1:1 e estocadas a 4° C, por 1 semana.

4.9- Material vegetal

As cascas de *A. parvifolium*. foram coletadas em Paracatú e sua determinação taxonômica foi realizada pelo Prof. Dr. Júlio Antônio Lombardi, do Depto de Botânica, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG. Uma exsicata foi depositada no Herbário do ICB, UFMG, Belo Horizonte.

As amostras de folhas e galhos das espécies *A. ramiflorum*, *A. spruceanum* e *A. olivaceum* foram coletadas no Campus da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, em setembro de 2003, pelo Prof. Dr. Júlio Antônio Lombardi, àquela época no Depto de Botânica, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, e atualmente na UNESP-Rio Claro, SP. Também a determinação taxonômica foi feita pelo mesmo Professor. As exsicatas de *A. ramiflorum* e *A. spruceanum* foram depositadas no Herbário do ICB, UFMG, Belo Horizonte, MG, sob os registros BHCB 848 e BHCB 46274, respectivamente.

Os caules de *Esenbeckia febrifuga* foram coletados no Campus da UFMG, Belo Horizonte, MG e uma exsicata foi depositada no Herbário do ICB, UFMG, Belo Horizonte, sob o registro número 3825.

Todo o material vegetal foi lavado em água corrente, à temperatura ambiente, e submetido a dessecção, em estufa com circulação de ar, mantendo-se a temperatura entre 35 - 40° C. Após a secagem foi reduzido a pó, em moinho de facas, e acondicionados em frascos de vidros hermeticamente fechados. De parte deste material (no mínimo 100 g) preparou-se o extrato etanólico de cada espécie por percolação, ou em aparelho de Soxlet com diclorometano e etanol.

5- METODOS

5.1- Preparação dos extratos e caracterização fitoquímica

5.1.1- Obtenção dos extratos

Uma parte do pó de cada planta foi submetida à extração por percolação exaustiva, com etanol a 96°GL. O percolato obtido foi concentrado em rotavapor, 50° C, sob pressão reduzida, fornecendo resíduos que foram armazenados em dessecador até peso constante.

Outra parte do pó foi tratada com hidróxido de amônio, colocado em cartucho e extraído, sucessivamente, em aparelho de Soxhlet, com diclorometano e etanol 96°GL. Os percolatos obtidos foram concentrados em evaporador rotatório, a 50° C, sob pressão reduzida, fornecendo resíduos que foram armazenados em dessecador até peso constante.

5.1.2- Extração ácido-base

Ao extrato etanólico de cascas de *A. parvifolium* (10,0 g) adicionaram-se pequeno volume de etanol (<10 mL) e HCl aquoso a 3% (250 mL). Filtrou-se em funil de haste com filtro de papel pregueado e separou-se a solução aquosa ácida que foi extraída com diclorometano (3 x 250 mL), obtendo-se uma camada de diclorometano (APN-1), uma camada aquosa ácida (APA-1) e uma interfase (API-1). A APA-1 adicionou-se NH₄OH até pH 9 e extraiu-se com diclorometano (3 x 250 mL), obtendo-se uma camada aquosa alcalina (APAA) e uma camada orgânica (APT). APAA ainda foi extraída com clorofórmio (1 x 250 mL), obtendo-se a camada clorofórmica (APTC). O fluxograma deste processo encontra-se na Figura 11 (pg. 73).

Os extratos etanólicos de cascas de *A.parvifolium* (10,0 g) e de caules de *E. febrifuga* (97,1 g) foram solubilizados em reduzido volume de etanol (<10 mL) e HCl aquoso a 1N (250 mL) seguindo-se de extração com diclorometano (3 x 250 mL), obtendo-se uma camada de diclorometano (APN-2 e EFN) e uma camada aquosa ácida (APA-2 e EFA). A esta se adicionaram NH₄OH até pH 9 e extraiu-se com diclorometano (3 x 250 mL), obtendo-se uma camada aquosa alcalina (APAA e EFAA) e uma camada orgânica (APT-2 e EFT). O fluxograma destas extrações encontra-se na Figura 12 (pg. 74).

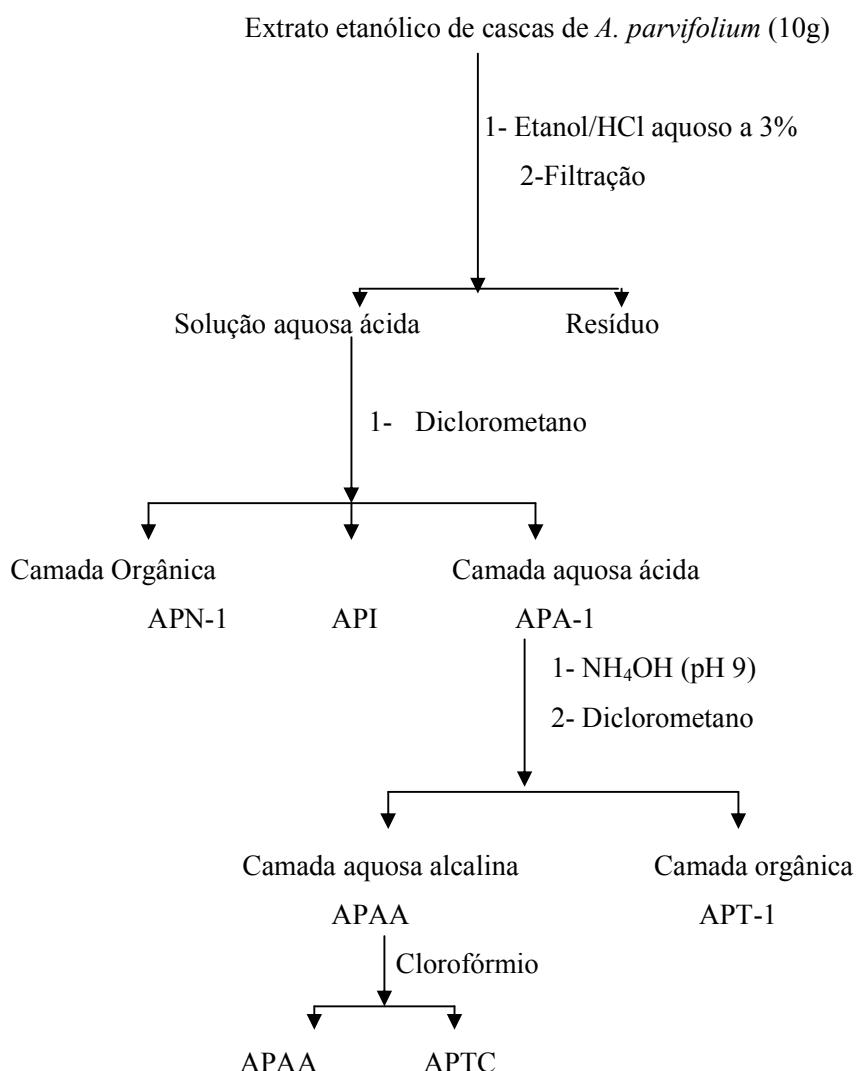


Figura 11: Fluxograma da extração ácido-base do extrato etanólico de cascas de *A. parvifolium*.
Legenda: APN1- fração diclorometano (neutros), API-1- fração intermediária, APA-1 camada aquosa ácida, APAA- camada aquosa alcalina, APT1- fração alcaloídica diclorometano e APTC- fração alcaloídica clorofórmica.

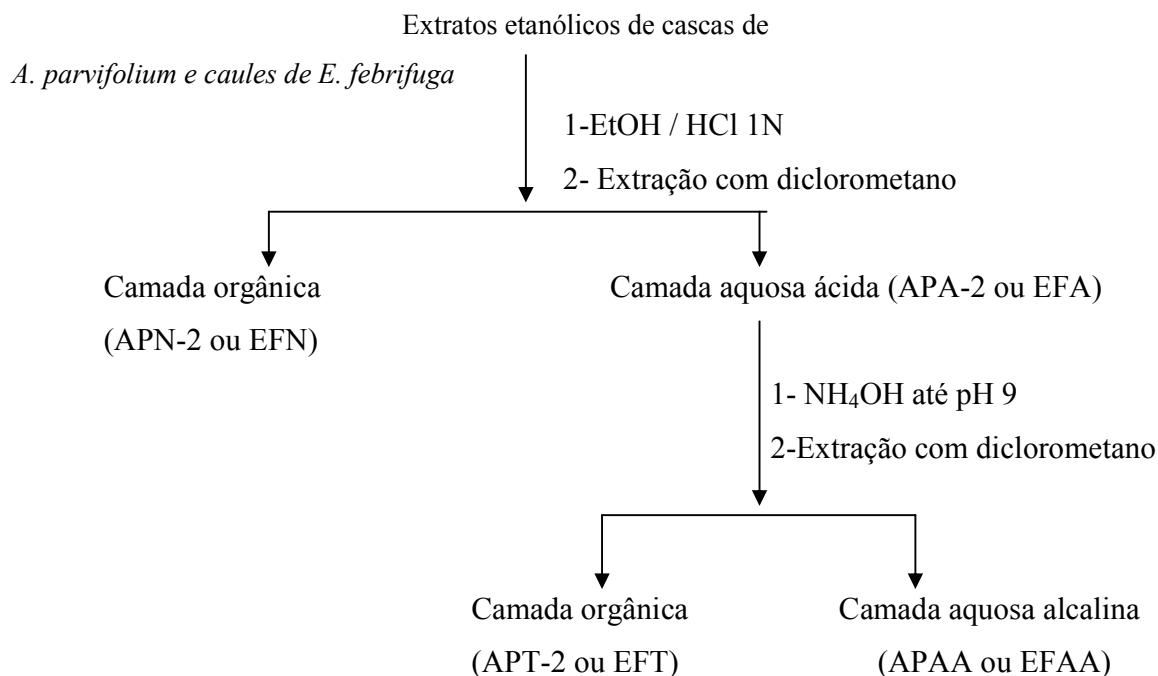


Figura 12: Fluxograma da extração ácido-base a partir dos extratos etanólicos de cascas de *A. parvifolium* e de caules de *E. febrifuga*.

Legenda: APN2 e EFN- fração diclorometano de neutros, APT2 e EFT- fração alcaloídica diclorometano, APAA e EFAA- camada aquosa alcalina.

5.2.- Estudos fitoquímicos

5.2.1- Prospecção fitoquímica por cromatografia em camada delgada de sílica gel (CCDS)

As amostras foram pesadas (mínimo de 10 mg) e solubilizadas em solventes adequados, em ultra-som, por 20 min. e aplicadas em cromatofolhas de sílica gel 60 (20x 10 cm). A pesquisa de diferentes classes de metabólitos foi realizada de acordo com as indicações da Tabela 3 (pg. 75).

Tabela 3: Prospecção por CCDS e classes de metabólitos secundários nos extratos e frações: classes pesquisadas, eluentes e reveladores utilizados.

Classes de metabólitos/ Referências	Eluentes	Reveladores	Observações
Alcalóides/ Wagner <i>et al.</i> , 1984	Acetato de etila: metanol: água (100:13,5:10). Tolueno: acetato de etila: dietilamina (70:20:10).	UV 253 e 365 nm Reagente de Dragendorff (RD)	UV: Manchas fluorescentes amarelas e azuis. RD: Manchas marrons e alaranjadas
2-Esteróides e Triterpenos/ Wagner <i>et al.</i> , 1984.	Acetato de etila: metanol: água (77:15:8) Diclorometano: acetato de etila (1:1)	Anisaldeído-H ₂ SO ₄ Liberman-Burchard (LB)	LB-Triterpenos pentaciclicos livres-manchas pardas a vermelhas; Esteróide livre-azuis seguidas de verde permanente.
3- Flavonóides/ Wagner <i>et al.</i> , 1984	Acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético: água (50:6,5:6,5:13) Clorofórmio: acetato de etila (60:40)	UV 253 e 365 nm Solução de Cloreto de alumínio a 10%	UV253:fluorescência escura ou amarela; UV 365: fluorescência azul, verde ou amarelo; AlCl ₃ : intensificação da fluorescência.
4- Cumarinas/ Wagner <i>et al.</i> , 1984	Acetato de etila: metanol (70:30)	UV 253 e 365 nm Solução de hidróxido de potássio a 5%	UV 365: Fluorescência azul, preta ou amarelo; KOH- intensificação da fluorescência.
5- Saponinas/ Wagner <i>et al.</i> , 1984	Clorofórmio: metanol (95:5)	Anisaldeido-sulfúrico ácido	Manchas violáceas

5.2.2- Perfís por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

5.2.2.1- Preparo das amostras

Quantidades exatas dos extratos e frações (10 a 20 mg) foram solubilizadas em 1,0 mL de metanol, os frascos foram deixados em banho de ultra-som por 30 minutos ou até máxima dissolução. Após a solubilização, estas amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 10.000 rpm, a fração solúvel foi transferida para o frasco para CLAE e os perfis cromatográficos foram determinados utilizando diferentes fases móveis para *A. parvifolium* e tampão fosfato pH 2,6: acetonitrila para as demais plantas.

5.2.2.2- Condições cromatográficas

A escolha das fases móveis foi realizada com base em diferentes trabalhos científicos. O comprimento de onda escolhido para leitura das amostras de *Aspidosperma* ($\lambda=300$ nm) baseou-se no espectro no UV da uleína (JÁCOME, 1998).

5.2.2.2.1- Condição cromatográfica 1

Coluna: RP-18

Eluente: gradiente de solução tampão fosfato pH 2,6 (A) e acetonitrila (B), 0 min 85% de A e 15% de B, em 30 min. 60% de A e 40% de B, em 40 min. 20% de A e 80% de B e em 50 min. 85% de A e 15% de B.

Temperatura: 30º C.

Detecção: UV a 300 nm.

Fluxo: 1 mL/min. por 50 min. (STÖCKIGT *et al.*, 2002; TIKHOMIROFF e JOLICOEUR, 2002).

5.2.2.2.2- Condição cromatográfica 2

Coluna: RP-18

Eluente: gradiente de solução tampão fosfato pH 2,6 contendo 2,5 mM de sal sódico de ácido hexanosulfônico (A) e acetonitrila (B), 0 min. 85% de A e 15% de B, em 30 min. 60% de A e 40% de B, em 40 min. 20% de A e 80% de B e em 50 min 85% de A e 15% de B.

Temperatura: 30º C.

Detecção: UV a 300 nm.

Fluxo: 1 mL/min. por 50 min. (STÖCKIGT *et al.*, 2002).

5.2.2.2.3- Condição cromatográfica 3

Coluna: RP-18

Eluente: água (A) e acetonitrila (B), 0 min. 85% de A e 15% de B, em 30 min. 60% de A e 40% de B, em 40 min. 20% de A e 80% de B e em 50 min. 85% de A e 15% de B.

Temperatura: 30º C.

Detecção: UV a 210 nm.

Fluxo: 1 mL/min. por 50 min..

5.2.2.2.4- Condição cromatográfica 4

Coluna: RP-18

Eluente: gradiente de solução tampão fosfato pH 2,6 (A) e acetonitrila (B), 0 min. 85% de A e 15% de B, em 30 min. 60% de A e 40% de B, em 40 min. 20% de A e 80% de B e em 50 min. 85% de A e 15% de B.

Temperatura: 30º C.

Detecção: UV a 2100 nm.

Fluxo: 1 mL/min. por 50 min..

5.2.2.3- Injeção das amostras

Foi utilizado como controle negativo a acetonitrila; foram analisados os extratos, as frações de neutros, as frações de alcalóides totais e as substâncias puras. Para identificação dos picos no extrato etanólico de cascas de *A. parvifolium* foram feitas co-injeções com uleína e aparicina. A fim de verificar a repetitividade dos resultados, foram feitas duas análises, sendo que, em cada vez, utilizou-se uma nova amostra do extrato.

5.2.3-Análise em CLAE acoplado a detector com arranjos de diodos (DAD)

5.2.3.1- Condição cromatográfica

Coluna: RP-18

Eluente: gradiente de solução de ácido fosfórico a 0,1% v/v (A) e acetonaítrila (B); 0 min. 95% A e 5% de B; 60 a 65 min. 5% de A e 95% de B; 70 min. 95% de A e 5% de B.

Temperatura: 40º C

Detecção: UV 210 nm

Fluxo: 1 mL/min. por 50 min..

O preparo das amostras e o modo de injeção foram semelhantes àqueles de outras análises realizadas no CLAE (5.2.2.1). As diferenças nas condições utilizadas nesta análise fundamentam-se em JÁCOME (1998).

5.2.4- Fracionamento da fração de alcalóides totais (APT-1) obtida por extração ácido-base do extrato etanólico de *A. parvifolium*

5.2.4.1- Por cromatografia de coluna

A fração APT1 (1,0 g) foi solubilizada em metanol, incorporada em sílica gel (1,0 g) e submetida à cromatografia em coluna aberta, empacotada com 50 g de sílica gel (0,063-0,200 mm) e n-hexano. Para eluição, empregaram-se misturas de solventes de polaridade crescente, conforme Tabela 4 (pg. 79). Foram recolhidas frações de volume variável e estas foram reunidas de acordo com seus perfis cromatográficos, resultando em 20 frações, denominadas de APT- F1 a 20.

Tabela 4: Dados referentes à coluna cromatográfica em sílica gel do APT-1 (1,0 g).

Eluente (volume)	Frações	Massa (mg)
1- Hexano (200 mL)	APP- F1	3,1
2- Hexano: Diclorometano 1:1 (250 mL)	APT- F2	6,8
3- Diclorometano (450 mL)	APT- F3	4,3
	APT- F4	2,3
4- Diclorometano: Acetato de Etila 9:1 (280 mL)	APT- F5	4,6
5- Diclorometano: Acetato de Etila 1:1 (350 mL)	APT- F6	3,2
	APT- F7	1,9
6- Acetato de Etila (700 mL)	APT- F8	0,9
	APT- F9	1,5
	APT- F10	1,5
7- Acetato de Etila: Metanol 1:1 (600 mL)	APT- F11	1,0
	APT- F12	176,0
	APT- F13	331,0*
	APT- F14	
	APT- F15	
8- Metanol (300 mL)	APT- F16	1,0
	APT- F17	1,7
9- Metanol: Água 1:1 (500 mL)	APT- F18	151,0
	APT- F19	90,0
	APT- F20	200
Total		981,8

Fase estacionária: sílica gel (50,0g); coluna de diâmetro de 2 cm e altura de 20 cm

Legenda: * As frações 13, 14, 15 e 16 foram reunidas e após a reunião determinou-se a massa.

A fração APT- F12 (176,0 mg) foi submetida a cromatografia em coluna utilizando-se com a fase estacionária o Sephadex LH-20 (diâmetro da coluna 2 cm e altura 26 cm), e como fase móvel o metanol. Foram obtidas 18 frações denominadas de APT-F12 (1 a 18). As frações APT- F13, APT- F14, APT- F15 e APT- F16 foram reunidas e submetidas à cromatografia em coluna de sílica gel (300mg) (0,063-0,200 mm) e como fase móvel utilizaram-se misturas de solventes de polaridade crescente, sendo obtidas 21 frações denominadas de APT-F13-16 (1 a 21). O esquema utilizado na eluição está mostrado na Tabela 5 (pg. 80).

Tabela 5: Dados referentes à coluna cromatográfica aberta do APT- F13-16 (300 mg).

Eluente (volume)	Fração	Massa (mg)
1-Clorofórmio (220 mL)	APT- F13-16 (1)	1,2
	APT- F13-16 (2)	0,6
	APT- F13-16 (3)	0,9
	APT- F13-16 (4)	0,6
2- Clorofórmio: Metanol 9,5: 0,5 (440 mL)	APT- F13-16 (5)	1,2
	APT- F13-16 (6)	0,5
	APT- F13-16 (7)	20,1
	APT- F13-16 (8)	29,1
	APT- F13-16 (9)	21,2
	APT- F13-16 (10)	23,2
	APT- F13-16 (11)	9,6

	APT- F13-16 (12)	1,2
	APT- F13-16 (13)	1,2
	APT- F13-16 (14)	1,5
	APT- F13-16 (15)	2,8
3- Clorofórmio: Metanol 9,0: 1,0 (150 mL)	APT- F13-16 (16)	3,2
	APT- F13-16 (17)	2,6
	APT- F13-16 (18)	3,2
4- Metanol (100 mL)	APT- F13-16 (19)	21,5
5- Metanol: Água 1:1 (200 mL)	APT- F13-16 (20)	45
	APT- F13-16 (21)	105,2
Total		295,6

Fase estacionária: Sephadex LH-20; coluna: diâmetro da coluna 2 cm e altura 26 cm.

A fração APT- F13-16 (10 a 11) (33,0 mg) foi submetida à cromatografia em coluna de Sephadex LH- 20 (diâmetro 2 cm e altura 26 cm), fase móvel metanol, obtendo-se 28 frações.

A fração APT- F12 (4-9) também foi submetida cromatografia em coluna de Sephadex LH-20 (diâmetro 2 cm e altura 26 cm), utilizando-se como fase móvel o metanol, obtendo-se 33 frações.

Todas as frações que apresentaram uma única mancha em CCDS, [APT- F13-16 (7); APT- F13-16 (8)], foram submetidas às seguintes análises: 1º Perfil em CLAE, 2º spectrometria no UV e IV; spectrometria de massa. Os resultados destas análises foram comparados aos dados contidos na tese de doutorado de Jácome (1998), para confirmação.

5.3- Avaliação da atividade antiplasmódica

5.3.1-Descongelamento dos clones de *P. falciparum*

A amostra foi retirada do crio-banco do Laboratório de Malária, IEC, Ananindeua, PA, e colocada em banho-maria ($37,5^{\circ}\text{C}$). Após completo descongelamento, adicionou-se, para cada 1 mL da suspensão, 0,4 mL de solução A (NaCl a 12%), gota a gota, com agitação, e após a adição a solução final foi deixada em repouso por 5 min..

Após repouso, acrescentaram-se 9,0 mL da solução B (NaCl a 1,6%), gota a gota, agitando-se levemente e centrifugou-se (2000 rpm/10 min.), separou-se e desprezou-se o

sobrenadante e ao sedimento adicionaram-se 9,0 mL de solução C (NaCl a 0,9% e glicose a 0,5%), em condições semelhantes a B. O sedimento obtido foi diluído em 20,0 mL de meio completo contendo 20% de plasma, e distribuído em 2 placas Petri.

5.3.2- Cultivo do *Plasmodium falciparum*

O cultivo foi realizado de acordo com Trager e Jensen (1976) e Jensen e Trager (1977). Após o descongelamento e, até ser observado que o crescimento do parasito estava em fase exponencial, utilizaram-se meio completo contendo 20% de plasma (do grupo sangüíneo O Rh+). Uma vez em crescimento exponencial, passaram-se a utilizar meio completo contendo 10% plasma. A cultura foi mantida em estufa a 37º C, em atmosfera de 3 a 5% de CO₂, conseguida através da queima de vela, em dessecador.

A parasitemia foi diariamente determinada e, quando maior que 6%, a placa era submetida à sincronização com sorbitol ou diluída.

5.3.3.- Coloração de gota espessa e esfregaço e determinação da parasitemia

Diariamente, durante o cultivo de *P. falciparum*, uma gota de material foi retirada e utilizada para a confecção de lâmina contendo a gota espessa e o esfregaço. A gota espessa foi secada à temperatura ambiente, seguindo-se sua desemoglobinização com azul de metileno e coloração com Giemsa, por 20 min.. O esfregaço foi secado em temperatura ambiente, fixado com metanol e corado com Giemsa, por 20 min.. As lâminas foram lavadas com água tamponada, secadas à temperatura ambiente e examinadas ao microscópio óptico, com objetiva de imersão (1000x).

As parasitemias nos esfregaços corados foram determinadas pela contagem do número de hemárias infectadas em 2000 células, no caso de parasitemia elevada (>10%). No caso de parasitemia menor que 10%, fazia-se uma estimativa do número de hemárias por campo,

e calculava-se o número de campos que deveriam ser contados para se obter um total de 5.000 a 10.000 hemácias.

Quando o objetivo era realizar a sincronização ou microteste, determinava-se a parasitemia diferencial, onde se contavam, no total, 100 parasitos classificando-os como trofozoítos ou esquizontes. Na Figura 13 estão representadas às diferentes formas do parasito.

5.3.4- Sincronização dos parasitos

De placas contendo predominantemente trofozoítos e com parasitemia maior que 6%, o meio era removido e era adicionada uma solução aquosa contendo 5% de sorbitol e 0,5% de glicose. Após 10 a 15 min. adicionava-se o meio completo e centrifugava-se por 5 min.. O sobrenadante era desprezado, adicionava-se meio completo e novamente era determinada a parasitemia diferencial (Figura 13) (CARVALHO, 1990). Após 48h da sincronização, caso fosse observada a predominância de trofozoitos (>90%), realizava-se o ensaio.

5.3.5-Congelamento dos clones *P. falciparum*

O congelamento dos clones foi realizado de acordo com a técnica descrita por Meryman e Hornblower (1972). Os parasitos foram congelados em uma solução de glicerol a 57% (Glycerolyte). O sangue infectado contendo, predominantemente, trofozoítos (parasitemia > 10%), foi centrifugado a 2000 rpm/ 10 min., sendo desprezado o sobrenadante. Para cada 1,0 mL de sedimento adicionaram-se 1,0 mL de *glycerolyte*, a suspensão foi distribuída em ampolas e estocadas em nitrogênio líquido.

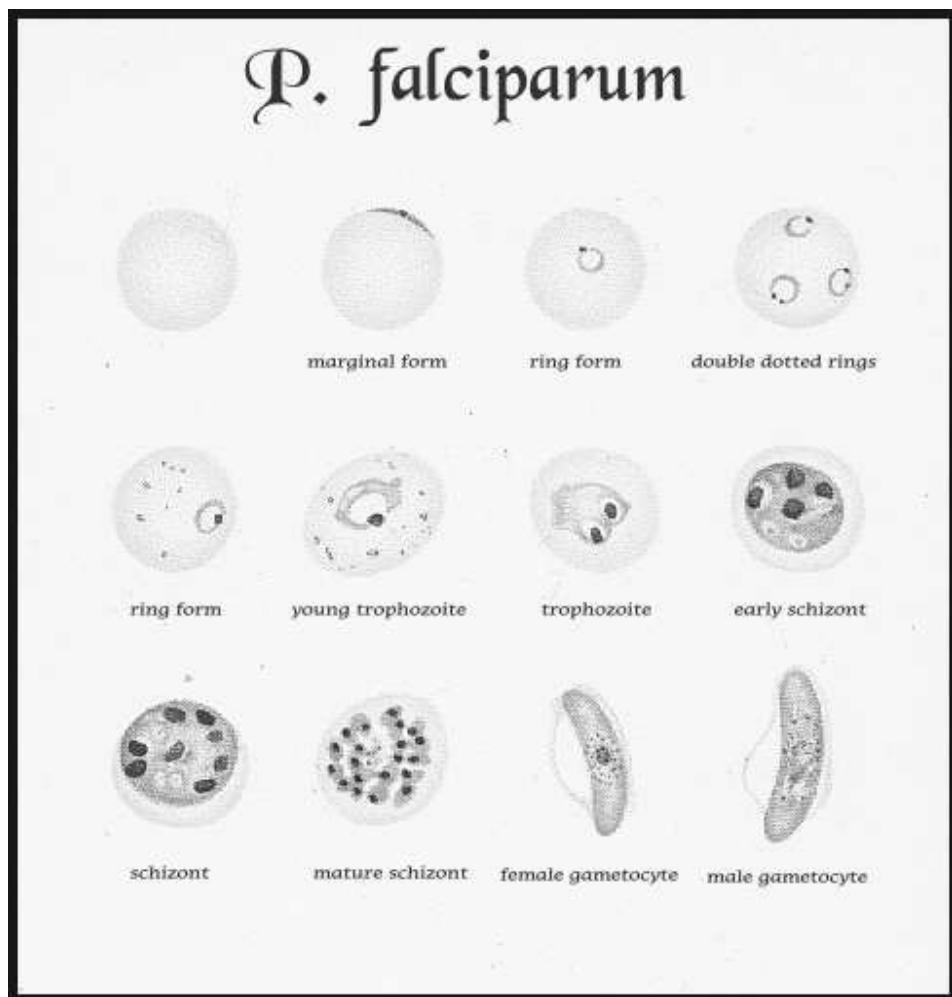


Figura 13: Diferentes estágios do *P. falciparum*.

5.3.6- Preparo das placas contendo 96 poços utilizadas nos ensaios

As amostras foram pesadas em balança analítica (extratos e frações= 10 mg e substâncias puras= 1 mg) e solubilizadas em metanol (10 mg foram solubilizados em 10 mL e 1 mg em 1 mL). Em seguida foram feitas diluições sucessivas (1 mL de solução : 1 mL de metanol), e a distribuição nas placas contendo 96 poços (Figura 14, pg. 84) foi feita de acordo com esquema mostrado na Tabela 6 (pg. 84).

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

Figura 14: Esquema da placa de 96 poços utilizada nos ensaios para atividade antiplasmódica.

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

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

Método utilizando a [8- ³ H] hipoxantina			Microteste tradicional		
Colunas	Linhhas	Amostras	Colunas	Linhhas	Amostras
1-6	A	Controle	1-12	A	Controle
7-12	A	Controle solvente	1-12	B	Controle solvente
1-6	B	20 µg da amostra /poço	1-12	C	20 µg da amostra /poço
7-12	B	Hemárias não parasitadas	1-12	D	10 µg da amostra /poço
1-6	C	20 µg da amostra /poço	1-12	E	5 µg da amostra /poço
1-6	D	10 µg da amostra /poço	1-12	F	2,5 µg da amostra /poço
1-6	E	5 µg da amostra /poço	1-12	G	1,25 µg da amostra /poço
1-6	F	2,5 µg da amostra /poço	1-12	H	0,625µg da amostra /poço
1-6	G	1,25 µg da amostra /poço	-	-	-
1-6	H	0,625µg da amostra /poço	-	-	-

As placas permaneciam destampadas dentro do fluxo laminar até completa evaporação do metanol, sendo depois tampadas, lacradas e guardadas a -4º C, até o momento do ensaio. Nos ensaios isotópicos, adicionou-se uma solução de dimetilsulfóxido a 0,05% à suspensão contendo os parasitos (parasitemia 1% e hematócrito 2,5%). No microteste tradicional, esta solução a 0,05% de dimetilsulfóxido só foi adicionada para extratos e frações com baixa hidrossolubilidade. Caso não fosse possível determinar a CI₅₀, novas placas eram preparadas contendo outras diluições.

5.3.7- Microteste utilizando [8-³H]-hipoxantina

Ensaio realizado de acordo com a técnica descrita por Desjardins e col (1979). Setenta e duas horas antes da realização do experimento, os parasitas eram cultivados em meio sem hipoxantina. A sincronização do cultivo foi feita 48 h antes do experimento.

Como controles utilizaram-se: 1- solução contendo hemárias parasitadas com a mesma parasitemia e hematócrito das “amostras testes”, onde se adicionou a hipoxantina e considerou-se como 100% de emissão; 2- solução contendo apenas hemárias não parasitadas com o mesmo hematócrito das demais amostras onde se adicionou a hipoxantina; 3- solução contendo hemárias parasitadas com a mesma parasitemia e hematócrito das demais amostras, onde não se adicionou a hipoxantina; e 4-substâncias cuja atividade como esquizonticida sanguíneo encontram-se amplamente descritas na literatura (cloroquina e mefloquina).

Inicialmente, foram utilizadas as concentrações descritas na Tabela 6 (pg. 84). Quando os resultados obtidos nestas concentrações não permitiram o cálculo da CI₅₀, novas diluições foram realizadas e o ensaio foi refeito. Para cada ensaio foram utilizados 6 poços por concentração e o ensaio foi repetido, no mínimo, 2 vezes.

Para a realização dos ensaios utilizou-se uma suspensão do parasito com parasitemia de 1,0%, hematócrito 2,5% e este foi distribuído (200 µL /poço) em placas contendo os extratos/frações/substâncias em diferentes concentrações. Após a distribuição, as placas

foram mantidas em estufa a 37º C, em atmosfera de 3 a 5% de CO₂ obtida através da queima de vela, em dessecador. Após 24 h, adicionou-se 0,5 Ci de [8-³H]-hipoxantina para cada poço.

As placas retornaram para a estufa por mais 18 h, e após este período, foram mantidas a –20º C por, no mínimo, 24 h. A leitura foi realizada em beta-cintilador, e de posse destes dados, calculou-se a CI₅₀, utilizando-se o Graph Pad Prism 4,0 para este cálculo.

5.3.8- Microteste tradicional

A metodologia utilizada neste ensaio foi descrita por Rieckmann e cols. (1978) modificada por Carvalho (1990). A forma de preparo da placa e as concentrações utilizadas, inicialmente, neste ensaio estão descritas no item 5.3.6 e Tabela 6 (pg. 84).

Neste ensaio utilizaram-se os seguintes controles: 1- controle sem substância e sem solvente, sendo sua parasitemia considerado o 100% experimental; 2- Controle do solvente, onde a parasitemia deve ser igual a do controle 1; 3- controle positivo, onde foi utilizada uma droga antimalária (cloroquina ou mefloquina) em diferentes concentrações.

Cultivos sincronizados contendo, predominantemente, trofozoítos (>90%), eram diluídos para 0,5%, o hematócrito ajustado para 2,5% e distribuídos em placas contendo o extratos/frações/substâncias em diferentes concentrações. Após 24 e 48 h trocava-se o meio adicionando-se nova dose do extrato ou substância. Após setenta e duas horas foram confeccionados os esfregaços. No esfregaço determina-se a parasitemia percentual.

De posse das parasitemias percentuais, calculou-se a CI₅₀ utilizando-se o método Graph Pad Prism 4,0.

5.4- Avaliação da citotoxicidade (CC₅₀) em células VERO

A avaliação da citotoxicidade foi realizada no Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, pelo Ms. Geraldo Célio Brandão, sob orientação da Profa. Dra. Erna Geessen Kroon.

5.4.1- Ensaio colorimétrico do MTT

Placas de 96 poços foram preparadas com suspensão de células VERO (Células de rins de macaco verde) (aproximadamente 40.000 células/cavidade) em meio de cultura MEM 5% soro fetal bovino (SFB), e foram incubadas por 24 horas, em estufa a 37°C, em atmosfera contendo 5% de CO₂, para formação da monocamada.

Após a formação da monocamada celular, o meio de cultura foi removido, e em seguida, foram adicionadas soluções de substâncias testes (200 µL) em concentrações que variaram entre 500 e 4 µg/mL, em 4 replicatas para cada concentração. As placas foram novamente incubadas em estufa a 37°C, em atmosfera contendo 5% de CO₂.

Após de 48 horas de incubação, o sobrenadante foi removido e, em seguida, foram adicionados 28 µl de uma solução de sal de tetrazolio (MTT) (2 mg/mL em tampão fosfato), em cada cavidade. As placas foram incubadas por 1 h. e 30 min. a 37°C; após este tempo de incubação, foram adicionados 130 µL de dimetilsufoxido, em cada cavidade para dissolver os cristais de formazana. As placas foram mantidas em agitação, por 15 min. (Shaker) e a densidade ótica (DO) foi determinada em 492 nm (DO₄₉₂) em leitor de microplacas. A multiplicação celular foi comparada com controles sem tratamento (controle negativo) sendo os ensaios foram conduzidos simultaneamente (TWENTNAN e LUSCOMBE, 1987).

A toxicidade celular foi expressa em termos de concentração citótica a 50% (CC₅₀). A porcentagem citotóxica é calculada como [(A-B)/A]x100, onde A e B são a DO₄₉₂ (densidade ótica) dos poços onde estão presentes células não tratadas (A) e tratadas (B), respectivamente.

5.4.2- Cálculo do índice de seletividade

O índice de seletividade foi calculado pela razão entre a CC₅₀ e a CI₅₀, obtida no microteste tradicional (MITAINE-OFFER *et al.*, 2002).

5.5- Alguns parâmetros utilizados neste trabalho, para avaliar a atividade antiplasmódica, citotoxicidade e índice de seletividade

Na avaliação da atividade antiplasmódica pelo método tradicional (RIECKMANN *et al.*, (1978) modificada por CARVALHO, 1990), e radioisotópico (DESJARDINS *et al.*, 1979) adotou-se o esquema onde, de acordo com a faixa de valores da CI₅₀ os extratos/frações/substâncias, eram classificadas: CI₅₀≤ 10,0 µg/mL- ativos; CI₅₀ entre 10 a 100 µg/mL- moderadamente ativos e CI₅₀> 100 µg/mL- inativos (BASCO *et al.*, 1994).

Na citotoxicidade para células VERO, pelo método colorimétrico do MTT, estabeleceu-se que extratos/frações/substâncias com CC₅₀≤ 100 µg/mL foram considerados muito tóxicos; 100 > CC₅₀> 500 µg/mL, moderadamente tóxicos e CC₅₀≥ 500 µg/mL, baixa toxicidade.

Em relação ao índice de seletividade (IS) considerou-se: IS ≤ 100- baixo; 100< IS ≤ 300 moderado e IS > 300- elevado (WRIGTH *et al.*, 1994).

6- RESULTADOS

6.1- Obtenção de extratos, caracterização fitoquímica, atividade antiplasmódica e citotoxicidade das espécies de *Aspidosperma*

6.1.1- Obtenção dos extratos

Na Tabela 7 (pg. 89) estão listados parte da planta, método utilizado para extração, solvente e rendimentos de cada tipo de extrato obtido de *A. olivaceum*, *A. ramiflorum* e *A. spruceanum*. Observa-se que os melhores rendimentos, em geral, foram obtidos nos extratos de folhas (Tabela 7, pg. 89).

Tabela 7: Condições utilizadas na preparação dos extratos, quantidade do pó das plantas e rendimentos dos processos extractivos.

Parte da Planta	Método de Extração	Solvente	Quantidade do pó (g)	Quantidade de extrato (g)	Rendimento (%)
<i>Aspidosperma olivaceum</i>					
Folhas (Fo)	Soxhlet (S)	DCL	98,0	11,8269	12,1
		ETOH		8,2041	8,4
Caules (Ca)	Percolação (P)	ETOH	116,0	2,3302	
		DCL	79,3	3,4140	4,3
		ETOH		0,5259	
Cascas (Cs)	Soxhlet (S)	DCL	65,4	1,475	2,3
		ETOH		5,4136	
<i>Aspidosperma ramiflorum</i>					
Folhas (Fo)	Percolação (P)	ETOH	100,0	31,8352	31,8
		DCL	150,0	12,8300	8,6
		ETOH		11,4363	7,6
Caules (Ca)	Percolação (P)	ETOH	168,0	23,9785	14,3
		DCL	104,0	2,5503	2,4
		ETOH		9,0125	8,7
Cascas (Cs)	Soxhlet (S)	DCL	72,6	1,4853	2,0
		ETOH		0,7853	1,1
<i>Aspidosperma spruceanum</i>					
Folhas (Fo)	Percolação (P)	ETOH	100,0	19,5067	19,5
		DCL	33,5	4,0578	12,1
		ETOH		4,1230	12,3
Caules (Ca)	Percolação (P)	ETOH	64,0	2,2389	3,5
		DCL	104,0	0,4262	0,4
		ETOH		0,9040	0,9
Cascas (Cs)	Percolação (P)	ETOH	64,1	2,2334	3,5
		DCL	33,8	1,4467	4,3
		ETOH		0,4902	1,5

Legenda: DCL- diclorometano e ETOH- etanol.

Os extratos de *A. cylindrocarpon* e *A. tomentosum* foram preparados por Abreu e col. (2002) e Garcia (2000) neste laboratório. As amostras utilizadas encontravam armazenadas sob refrigeração (-20° C).

6.2- Análise e caracterização dos extratos

6.2.1- Cromatografia em Camada Delgada de Sílica

Inicialmente, foi realizada uma prospecção fitoquímica dos extratos etanólicos e diclorometano, os resultados estão na Tabela 8 (pg. 94).

Prospecção fitoquímica de caules-folhas de *A. cylindrocarpon* mostrou a presença de alcalóide, triterpenos ou esteróides e saponinas (Tabela 8, pg. 94).

Análises em CCDS dos extratos de *A. olivaceum* demonstraram que os extratos DCL-S (Fo), DCL-S (Ca), DCL-S (Cs) e ETOH-P (Cs) provavelmente contenham saponinas. Para triterpenos/esteróides, os seguintes extratos apresentaram resultados positivos: DCL-S (Fo), ETOH-S (Fo) e ETOH-P (Ca). A presença de flavonóides foi detectada em ETOH-S (Ca), DCL-S (Cs) e ETOH-P (Cs). Com os extratos DCL-S (Ca), ETOH-P (Ca), DCL-S (Cs) e ETOH-P (Cs) foram obtidos resultados positivos para alcalóides (Tabela 8, pg. 94).

Os extratos ETOH-P (Fo), DCL- S (Fo), ETOH-S (Fo), DCL-S (Ca) e DCL-S (Cs) de *A. ramiflorum* revelaram, positivamente, em CCDS, para saponinas, triterpenos-esteróides, flavonóides e alcalóides. O extrato ETOH-P (Ca) revelou positivamente para flavonóides e alcalóides, enquanto que, o extrato ETOH-S (Ca) contém alcalóides. Em nenhum extrato se observaram cumarinas (Tabela 8, pg. 94).

CCDS dos extratos de *A. spruceanum* demonstrou ausência de flavonóides e cumarinas. Apenas os extratos obtidos das cascas (ETOH-P, DCL-S e ETOH-S) da planta revelaram positivamente para alcalóides, enquanto que, para saponinas, todos os extratos, exceto ETOH-S (Fo), foram positivos. Em relação aos triterpenos e esteróides, os únicos extratos que não revelaram de forma positiva foram ETOH-S (Fo) e ETOH-S (Ca) (Tabela 8, pg. 95).

O extrato etanólico obtido de caules (Ca) de *A. tomentosum* revelou positivamente, em CCDS, para alcalóides, triterpenos, esteróides e flavonóides. Os extratos etanólicos de frutos (Fr), folhas (Fo) e sementes (Se) revelaram, em CCDS, para triterpenos, esteróides e saponinas. Em Fr e Se foram observados resultados positivos para alcalóides e para os extratos de folhas e frutos obtiveram-se resultados positivos para flavonóides (Tabela 8, pg. 95).

6.2.2- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Para o extrato ETOH-P de *A. cylindrocarpon* (Ca-Fo) quando se utilizou a fase móvel sem ou com o sal sódico do ácido hexanosulfônico os picos tiveram tempos de retenção de 1,46 e 1,58 min, e estes são, provavelmente, os picos relacionados alcalóides presentes neste extrato (Anexo 1, pg.153; Tabela 8, pg. 94).

Nas análises por CLAE, realizados com os extratos de *A. olivaceum*, utilizou-se como substância de referência a uleína, que apresentou tempo de retenção de 2,15 min. Picos com tempos de retenção próximos foram observados nos extratos DCL-S (Fo) (TR= 2,36 min), DCL (Ca) (TR= 2,24 min) e DCL-S (Cs) (TR= 2,24 min). Outros extratos apresentaram picos intensos que, provavelmente, estão relacionados a alcalóides: ETOH-P (Ca) (TR= 1,03 e 1,36 min) e ETOH-S (TR= 1,05 e 1,35 min) (Anexo 1, pg. 154; Tabela 8, pg. 94) , porém não foi possível realizar co-injeções, pois não se dispunha dos padrões de alcalóides de *A. olivaceum* e nem de quantidade suficiente de uleína para fazer as co-injeções.

Nos extratos de *A. ramiflorum*, os picos mais intensos, provavelmente relacionados a alcalóides, tiveram os seguintes tempos de retenção (TR): ETOH-P (Ca), TR= 1,08 e 1,34 min e DCL-S (Cs), TR= 1,37 min. Os demais extratos apresentaram picos de baixa intensidade (Anexo 1, pg. 156; Tabela 8, pg. 94).

Todos os extratos de *A. spruceanuam*, quando submetidos às análises em CLAE, apresentaram pico com TR entre 1,10 a 1,17 min. Além deste pico foram observados no extrato ETOH- (Fo) pico com TR= 1,50 min e para DCL-S (Fo) picos com TR= 1,51 e 1,92 min. Os resultados estão indicados na Tabela 8 (pg. 95) e no Anexo 1 (pg. 158).

Nos estudos e *A. tomentosun* realizados em CLAE utilizou-se como substância de referência a uleína, observando-se que apresentou TR= 2,15min. Picos com tempos de retenção entre 1,13- 1,18 min foram observados nos cromatogramas de todos os extratos. Os resultados obtidos em CLAE encontram-se na Tabela 8 (pg. 95) e no Anexo 1 (pg. 160).

6.3- Atividade antiplasmódica e citotoxicidade

Para realização dos ensaios que avaliaram a atividade antiplasmódica utilizou-se concentração onde a inibição do *P. falciparum* foi próximo de 100%, concentração(ões) em que a inibição foi entre 90 a 60%, concentrações cuja a inibição era entre 60 a 40% e concentrações menores cujo inibição foi inferior a 40%. Desta forma foi possível traçar uma curva e determinar as concentrações inibitórias. No presente trabalho serão mostradas apenas as concentrações inibitórias cinqüenta por cento (CI_{50}) e noventa por cento (CI_{90}) (Tabela 9, pg. 96). Alguns extratos, classificados como ativos no *P. falciparum* ($CI_{50} < 10 \mu\text{g/mL}$), foi submetido ao ensaio citotoxicidade utilizando células VERO, sendo determinada a concentração citotóxica cinqüenta por cento (CC_{50}) (Tabela 9, pg. 96).

Quando se utilizam modelos *in vivo* (animal) pode-se obter a dose letal cinqüenta por cento (DL_{50}) e a dose efetiva cinqüenta por cento (DE_{50}) e através da divisão da DL_{50} pela DE_{50} obtem-se o índice terapêutico (IT). Caso se utilizem modelos *in vitro*, o índice equivalente ao IT é o índice de seletividade (IS) que obtido pela divisão da CC_{50} pela CI_{50} (Tabela 10, pg. 97).

A atividade antiplasmódica do extrato etanólico de *A. cylindrocarpon* foi moderada (CI_{50} entre 10 a 100 $\mu\text{g/mL}$) para os clones W2 e 3d7. Em relação à cloroquina e à mefloquina (controles positivos), este extrato mostrou-se com menor atividade antiplasmódica, e a citotoxicidade para células VERO foi baixa ($CC_{50} > 500 \mu\text{g/mL}$), sendo os índices de seletividade 11,36 (W2) e 12,82 (3d7) (Tabela 9, pg. 96 e Tabela 10, pg. 98).

Os extratos DCL-S (Fo), ETOH- S (Fo), DCL-S (Ca), DCL-S (Cs) e ETOH-S (Cs) de *A. olivaceum* mostraram alta atividade em W2 ($CI_{50} < 10 \mu\text{g/mL}$); em 3d7 todos os extratos, exceto DCL-S(Fo), foram muito ativos ($CI_{50} < 10 \mu\text{g/mL}$) (Tabela 9, pg. 96). Os extratos DCL-S (Fo), DCL-S (Ca) e ETOH-S (Cs) apresentaram baixa citotoxicidade para

células VERO ($CC_{50} > 500 \mu\text{g/mL}$), porém seus índices de seletividade foram baixos ($IS < 100$) (Tabela 9, pg. 96 e Tabela 10, pg. 98).

Os extratos de *A. ramiflorum* que apresentaram maior atividade antiplasmódica em ambos os clones ($CI_{50} < 10 \mu\text{g/mL}$) foram DCL-S (Fo) e DCL-S (Cs). O extrato mais ativo em 3d7 foi ETOH-S (Ca), porém sua atividade em W2 foi moderada (Tabela 9, pg. 96). Os extratos DCL-S (Ca) e DCL-S (Cs) de *A. ramiflorum* foram submetidos aos ensaios de citotoxicidade, e mostraram-se pouco tóxicos ($CC_{50} > 500 \mu\text{g/mL}$), porém seus índices de seletividade foram baixos ($IS < 100$) (Tabela 9, pg. 96 e Tabela 10, pg. 98).

Os extratos DCL-S (Ca) e DCL-S(Cs) de *A. spruceanum* mostraram-se muito ativos em W2 ($CI_{50} < 10 \mu\text{g/mL}$). DCL-S (Ca) também foi muito ativo em 3d7, porém as atividades antiplasmódica destes extratos foram menor que da cloroquina e mefloquina. Os demais extratos de *A. spruceanum*, exceto CLOR-P (Ca) e ETOH-P (Fo), apresentaram atividade antiplasmódica moderada em 3d7. Em W2 os extratos mostraram atividade moderada, exceto DCL-S (Ca) e DCL-S(Cs) (Tabela 9, pg. 97). O extrato diclorometano de cascas de *A. spruceanum* apresentou citotoxicidade moderada ($100 < CC_{50} < 500 \mu\text{g/mL}$) e baixo índice de seletividade ($IS < 100$) (Tabela 9, pg. 97 e Tabela 10, pg. 98).

Os extratos etanólicos obtidos de diferentes partes de *A. tomentosum* apresentaram atividade antiplasmódica moderada em W2 (CI_{50} entre 20 e 27 $\mu\text{g/mL}$). Os extratos etanólicos obtidos de caules, folhas e frutos apresentaram atividade antiplasmódica moderada em 3d7 e o de sementes mostrou-se muito ativo em 3d7 ($CI_{50} = 3,03 \mu\text{g/mL}$). As CI_{50} de todos os extratos foram maiores que as CI_{50} da cloroquina e mefloquina (Tabela 9, pg. 97). O extrato etanólico de sementes de *A. tomentosum* também apresentou $CC_{50} > 500 \mu\text{g/mL}$, porém o IS (3d7) foi moderado ($>165,02$) (Tabela 9, pg. 97 e Tabela 10, pg. 98).

Tabela 8: Resultados das análises, por CCDS e CLAE de extratos de espécies pertencentes ao gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae).

Espécies	Parte da planta	Extrato/técnica	CCCDs	CLAE
			Classes de metabólitos	Condição usada na análise (C) = tempo de retenção (min.)
<i>Aspidosperma cylindrocarpon</i>	Caules-Folhas	ETOH-P	A, T,E e S	C1 e C2=1,46 e 1,58
<i>A. olivaceum</i>	Folhas	DCL-S	T, E e S	C1= 1,20 e 2,36
	Folhas	ETOH- S	T e E	C1= 1,15
	Caules	ETOH-P	A, T e E	C1= 1,03 e 1,36
	Caules	DCL-S	A e S	C1= 1,30 e 2,24
	Caules	ETOH-S	F	C1= 1,15 e 2,20
	Casca	DCL-S	A, S e F	C1= 1,30 e 2,24
	Casca	ETOH-S	A, S e F	C1= 1,05 e 2,10
Uleína	Cascas	ETOH-P	A	C1= 2,15
<i>A. ramiflorum</i>	Folhas	ETOH-P	A, S, T, E e F	C1=1,40 e 2,10
	Folhas	DCL-S	A, S, T, E e F	C1= 1,44 e 2,30
	Folhas	ETOH- S	A, S, T, E e F	C1= 1,20; 1,38 e 2,39
	Caules	ETOH-P	A e F	C1= 1,24; 1,56; 1,88 e 2,92
	Caules	DCL-S	A, S, T, E e F	C1= 1,42 e 2,12
	Caules	ETOH-S	A	C1= 1,38
	Casca	DCL-S	A, S, T, E e F	C1= 1,37 e 8,48
	Casca	ETOH-S	A e F	C1=1,88 e 2,92

Continua

Continuação da Tabela 8

Espécies	Parte da planta	Extrato/ técnica	CCCDs	CLAE
			Classes de metabólitos	Condição usada na análise (C) = tempo de retenção (min.)
<i>A. spruceanum</i>	Folhas	ETOH-P	S, T e E	C1 = 1,14 e 1,50
	Folhas	DCL- S	S, T e E	C1 = 1,17; 1,51 e 1,92
	Folhas	ETOH- S	ND	C1 = 1,12
	Caules	DCL- S	S, T e E	C1 = 1,17
	Caules	ETOH-S	S	C1 = 1,14
	Cascas	ETOH-P	A, S, T e E	C1 = 1,13
	Cascas	DCL- S	A, S, T e E	C1 = 1,11
	Cascas	ETOH-S	A, S, T e E	C1 = 1,1º
<i>A. tomentosum</i>	Caules	ETOH-P	A, T,E e F	C1 = 1,14; 1,32; 9,3 e 19,18
	Folhas	ETOH-P	S, T, E e F	C1 = 1,18
	Frutos	ETOH-P	A, S, T, E e F	C1 = 1,13 e 1,39
	Sementes	ETOH-P	A, S, T e E	C1 = 1,18 e 1,79

C1: Condição 1- Fase móvel: tampão fosfato pH 2,6 (A): Acetonitrila (B); T= 0 min: 85% A: 15% B; T= 5 min: 80% A: 20% B; T= 30 min: 60% A: 40% B; T= 40 min: 20% A: 80% B; T= 50 min: 85% A: 15% B. Temperatura= 30º C; Fluxo= 1 mL/min; detecção: λ 300 nm e coluna RP-18. **C2:** Condição 2- Fase móvel: tampão fosfato pH 2,6 + 2,5 mM de sal sódico de ácido hexanossulfônico (A): Acetonitrila (B). T= 0 min: 85% A: 15% B; T= 5 min: 80% A: 20% B; T= 30 min: 60% A: 40% B; T= 40 min: 20% A: 80% B; T= 50 min: 85% A: 15% B. Temperatura= 30º C; Fluxo= 1 mL/min; detecção: λ 300 nm e coluna RP-18.

Legenda: CCDS- cromatografia em camada delgada de sílica; CLAE- cromatografia líquida de alta eficiência; TR- tempo de retenção; ETOH- etanol; DCL- diclorometano; P- percolação; S- extração em aparelho de Soxhlet; A- alcalóides; T- triterpenos; E- esteróides; F- flavonóides; C- cumarinas e S- saponinas; ND- não determinado.

Tabela 9: Resultados da avaliação da atividade antiplasmódica e citotoxicidade de extratos de espécies pertencentes ao gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae).

Extratos	Clone W2		Clone 3d7		Células VERO
	CI ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$) ± DP	CI ₉₀ ($\mu\text{g/mL}$) ± DP	CI ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$) ± DP	CI ₉₀ ($\mu\text{g/mL}$) ± DP	CC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)
<i>Aspidosperma cylindrocarpon</i>					
ETOH-P- Ca-Fo	44,0 ± 6,36	104,5 + 6,36	39,0 ± 2,83	89,0 ± 7,07	>500
<i>A. olivaceum</i>					
DCL-S(Fo)	7,0 ± 0,2	23,0 ± 0,2	25,5 ± 2,12	49,5 ± 6,3	>500
ETOH- S (Fo)	7,0 ± 0,71	26,5 ± 0,71	5,0 ± 2,80	24,5 ± 2,10	ND
DCL-S (Ca)	<6	ND	<6	ND	>500
DCL-S (Cs)	<6	ND	<6	ND	ND
ETOH-S (Cs)	5,0 ± 2,8	24,5 ± 2,8	7,0 ± 0,42	26,5 ± 0,71	>500
<i>A. ramiflorum</i>					
ETOH-P (Fo)	32,8 ± 1,13	61,75 ± 1,13	20,5 ± 0,71	60,5 ± 0,71	ND
DCL-S (Fo)	<6	ND	<6	ND	ND
ETOH-P (Ca)	36,5 ± 0,20	100,0 ± 0,20	48,0 ± 1,1	103,0 ± 1,4	ND
DCL-S(Ca)	ND	ND	9,5 ± 1,41	27,0 ± 1,41	>500
ETOH-S (Ca)	19,75 ± 0,35	30,75 ± 0,35	0,98 ± 0,03	16,0 ± 2,8	ND
DCL- S(Cs)	<6	ND	<6	ND	>500

Continua

Continuação da Tabela 9:

Extratos	Clone W2		Clone 3d7		Célula VERO
	Cl ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$) ± DP	Cl ₉₀ ($\mu\text{g/mL}$) ± DP	Cl ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$) ± DP	Cl ₉₀ ($\mu\text{g/mL}$) ± DP	CC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)
<i>A. spruceanum</i>					
ETOH-P (Fo)	65,0 ± 4,2	107,8 ± 0,71	>100	ND	ND
DCL- S (Fo)	23,25 ± 0,35	47,0 + 2,83	35,0 ± 4,2	63,5 ± 0,7	ND
ETOH- P (Ca)	29,52 ± 0,71	ND	41,5 ± 2,12	101,5 ± 9,1	ND
DCL- S (Ca)	<6,0	ND	< 6,0	ND	109,6
CLOR-P (Ca)	37,0 +7,1	102,0 + 2,8	>100	ND	ND
ETOH-P (Cs)	26,25 ± 4,07	48,50 ± 3,18	14,0 ± 4,2	30,0 ± 2,83	ND
DCL- S(Cs)	< 6,0	ND	15,75 ± 1,76	28,5 ± 0,71	ND
ETOH-S (Cs)	28,01 ± 3,51	52,03 ± 2,83	19,0 ± 2,83	50,5 ± 2,12	ND
<i>A. tomentosum</i>					
ETOH-P (Ca)	26,50 ± 3,50	54,75 ± 1,09	25,00 ± 4,24	61,00 ± 4,24	ND
ETOH-P (Fo)	23,75 ± 1,06	47,00 ± 2,83	27,00 ± 5,66	47,00 ± 5,66	ND
ETOH-P (Fr)	20,52 ± 1,41	37,53 ± 0,71	38,55 ± 1,06	99,54 ± 4,95	ND
ETOH-P (Se)	24,51 ± 3,56	54,75 ± 1,09	3,03 ± 0,20	27,03 ± 0,20	>500
Controles positivos					
Cloroquina	0,02 ± 0,002	ND	0,0013 ± 0,0001	0,0020 ± 0,0001	ND
Mefloquina	0,0165 ± 0,002	0,0895 ± 0,02	0,048 ± 0,0007	0,0975 ± 0,0007	ND

Legenda: Cl₅₀= Concentração inibitória 50%; Cl₉₀= Concentração inibitória 90%; CC₅₀= Concentração citotóxica 50%; DP= desvio padrão; W2- clone resistente a cloroquina e sensível a mefloquina; 3d7- clone sensível a cloroquina; DCL-S (Fo)- extrato diclorometano de folhas obtido em aparelho de Soxhlet; ETOH-S (Fo)- extrato etanólico de folhas obtido em aparelho de Soxhlet; ETOH-P (Ca)- extrato etanólico de caules obtido por percolação; DCL-S (Ca)- extrato diclorometano de caules obtido em aparelho de Soxhlet; DCL-S (Cs)- extrato diclorometano de cascas obtido em aparelho de Soxhlet; ETOH-P (Cs)- extrato etanólico de cascas obtido em aparelho de Soxhlet; CLOR (Ca)- extrato clorofórmico de caules obtido em aparelho de Soxhlet e ND- não determinado.

Tabela 10: Índices de seletividade (IS) para extratos obtidos de diferentes espécies de *Aspiodisperma* (Apocynaceae) ensaiadas para citotoxicidade e atividade antiplasmódica.

Espécies	Extratos	CC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)	IS (W2)	IS (3d7)
<i>A. cylindrocarpon</i>	ETOH-P- Ca-Fo	>500	>11,36	> 12,82
<i>A. olivaceum</i>	DCL-S(Fo)	>500	>71,43	>19,61
	DCL-S (Cs)	>500	> 83,33	> 83,33
	ETOH-S (Cs)	>500	> 100,00	> 71,43
<i>A. ramiflorum</i>	DCL-S (Fo)	>500	ND	> 52,63
	DCL-S(Ca)	>500	> 83,33	> 83,33
<i>A. spruceanum</i>	DCL- S (Ca)	109,6	18,27	>18,27
<i>A. tomentosum</i>	ETOH-P (Se)	>500	>20,4	>165,02

Legenda: CC₅₀= Concentração citotóxica 50%; DP= desvio padrão; W2- clone resistente a cloroquina e sensível a mefloquina; 3d7- clone sensível a cloroquina; IS- índice de seletividade; DCL-S (Fo)- extrato diclorometano de folhas obtido em aparelho de Soxhlet; ETOH-S (Fo)- extrato etanólico de folhas obtido em aparelho de Soxhlet; ETOH-P (Ca)- extrato etanólico de caules obtido por percolação; DCL-S (Ca)- extrato diclorometano de caules obtido em aparelho de Soxhlet; DCL-S (Cs)- extrato diclorometano de cascas obtido em aparelho de Soxhlet e ETOH-P (Cs)- extrato etanólico de cascas obtido em aparelho de Soxhlet.

6.4- Fracionamento do extrato etanólico de cascas de *A. parvifolium*

6.4.1- Descrição da obtenção do extrato etanólico das cascas, frações e caracterização por cromatografia em camada delgada e cromatografia líquida de alta eficiência

O extrato etanólico de cascas de *A. parvifolium* foi submetido a dois processos extractivos (Figura 9, pg.73 e Figura 10, pg. 74), sendo obtidas as frações de neutros e alcalóides totais. Os rendimentos de cada processo extractivo encontram-se na Tabela 11 (pg. 99). Visando facilitar a distinção das frações adotou-se que as frações do processo extractivo 1 sempre teriam o número 1 (APN-1, APT-1 e APTC) e a do processo 2 o número 2 (APN-2 e APT-2).

O extrato etanólico e as frações foram submetidos a análises cromatográficas em CCDS e CLAE, utilizando-se a uleína como controle para alcalóides. Na prospecção fitoquímica do extrato etanólico de cascas de *A. parvifolium*, por CCDS, foi detectada a presença de alcalóides e flavonóides. O fracionamento de APN levou ao isolamento do lupeol, estigmasterol e aparicina e no fracionamento de APT foram isolados uleína e epiuleína (JÁCOME, 1998 e JÁCOME *et al.*, 2004).

Tabela 11: Rendimentos nas extrações de alcalóides a partir do extrato etanólico de cascas de *A. parvifolium*.

Processo extractivo 1 (Figura 9, pg. 73)			Processo extractivo 2 (Figura 10, pg. 74)		
	Massa (g)	Rendimento (%)		Massa (g)	Rendimento (%)
ETOH-P	55,2	-	ETOH-P	10,0	-
APN-1	8,7	15,8	APN-2	0,5	5,4
APT-1 (dclorometano)	3,8	7,0	APT-2	1,7	17,3
APTC	1,1	0,5	NO	NO	NO

Legenda: APN-1- fração de neutros 1; APT-1- fração alcaloídica 1; APTC fração alcaloídica obtida com clorofórmio, NO- não foi obtida neste processo.

No presente trabalho, em todas as amostras analisadas, foram detectados alcalóides, triterpenos e esteróides, e as análises foram negativas para cumarinas. No extrato etanólico, APN-1 e APN-2 observaram-se, ainda, a presença de saponinas. Já, no extrato etanólico, APT-1 e APT-2 foi observada a presença de flavonóides. Os resultados encontram-se sumarizados na Tabela 12 (pg. 100).

A Figura 15 (pg. 100) mostra uma placa cromatográfica (CCDS) revelada com anisaldeído- ácido sulfúrico, onde a coloração azul aparece em todas as amostras e está relacionada à presença dos alcalóides.

Nas análises por CLAE, os TRs dos picos, provavelmente relacionados a alcalóides do extrato etanólico de *A. parvifolium*, frações e uleína estão na Tabela 12 (pg. 100) e os cromatogramas são mostrados na Figura 16 (pg. 101 e 102).

Tabela 12: Análise do extrato etanólico de cascas de *A. parvifolium* (Apocynaceae) e frações em cromatografia em camada delgada de sílica e cromatografia líquida de alta eficiência.

Amostras	CCDS	CLAE: TR (min)
	Classes de metabólitos	Condição usada na análise (C) = tempo de retenção (min.)
Extrato	A, T, E, F e S	1,38; 1,89; 4,36; 7,64 e 9,56
APN-1	A, E e S	1,30 e 1,87
APN-2	A, T, E, F e S	1,41 e 2,16
APT-1	A, E e F	1,54 e 2,14
APT-2	A, T, E e S	1,41 e 2,09
Uleína (18)	A	2,15

Fase móvel: tampão fosfato pH 2,6 (A): acetonitrila (B); T= 0 min: 85% A: 15% B; T= 5 min: 80% A: 20% B; T= 30 min: 60% A: 40% B; T= 40 min: 20% A: 80% B; T= 50 min: 85% A: 15% B. Temperatura= 30° C; Fluxo= 1 mL/min; detecção: λ 300 nm e coluna RP18.

Legenda: CCDS- cromatografia em camada delgada de sílica; CLAE- cromatografia líquida de alta eficiência; TR- tempo de retenção; APN-1- fração de neutros 1, APT-1- fração alcaloídica 1; APN-2- fração de neutros 2 e APT-2- fração alcaloídica 2.

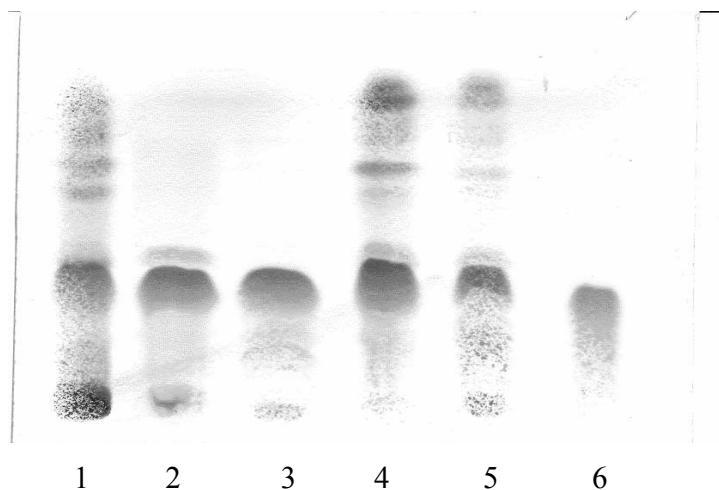
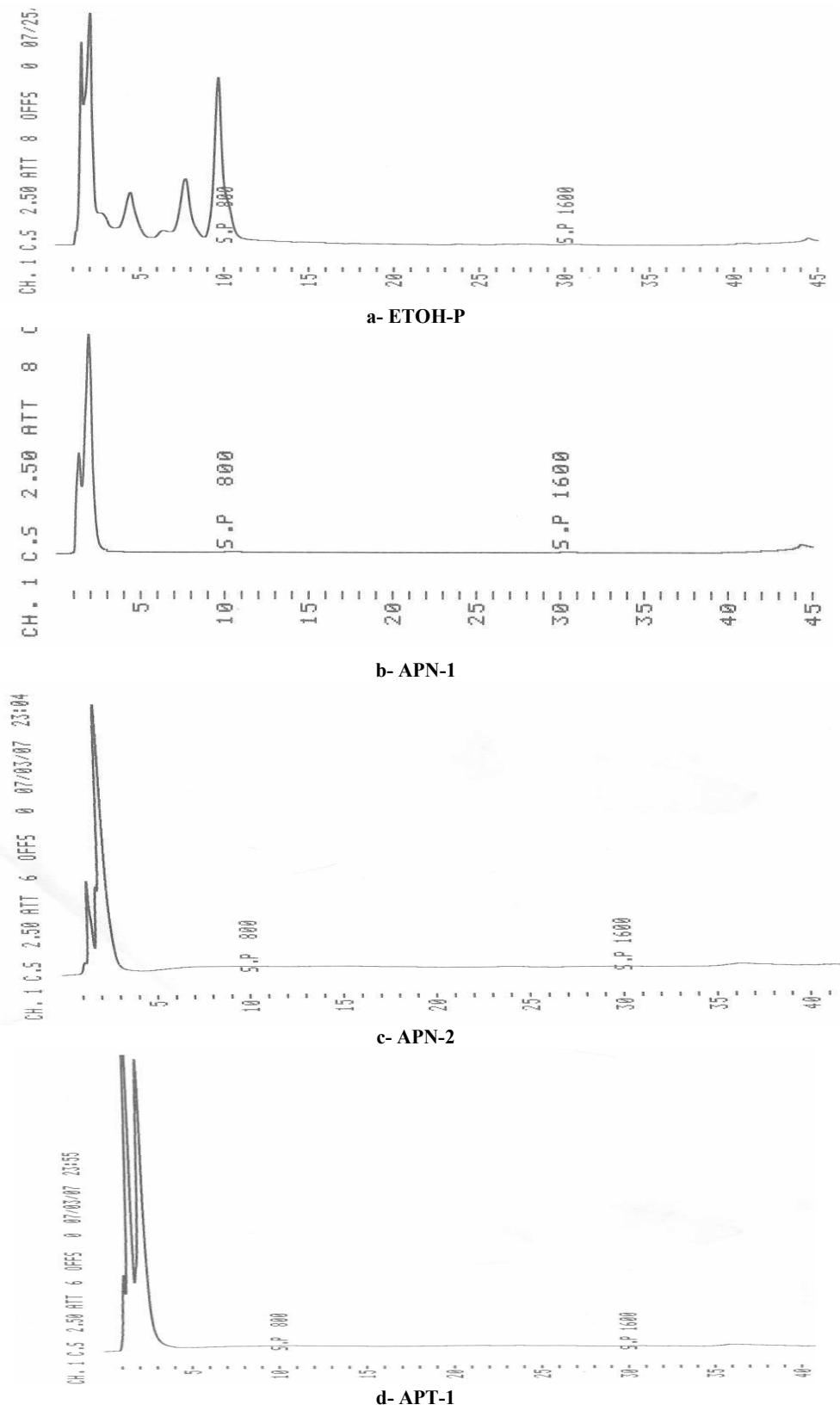


Figura 15: Cromatografia em camada delgada de sílica gel do extrato etanólico de cascas de *A. parvifolium*, frações e uleína.

Legenda: Eluente: acetato de etila: metanol: água (100:13,5:10). Revelador: anisaldeído- ácido sulfúrico. 1- Extrato etanólico; 2- APN-2; 3- APT-2; 4-APN-1; 5-APT-1 e 6- Uleina.



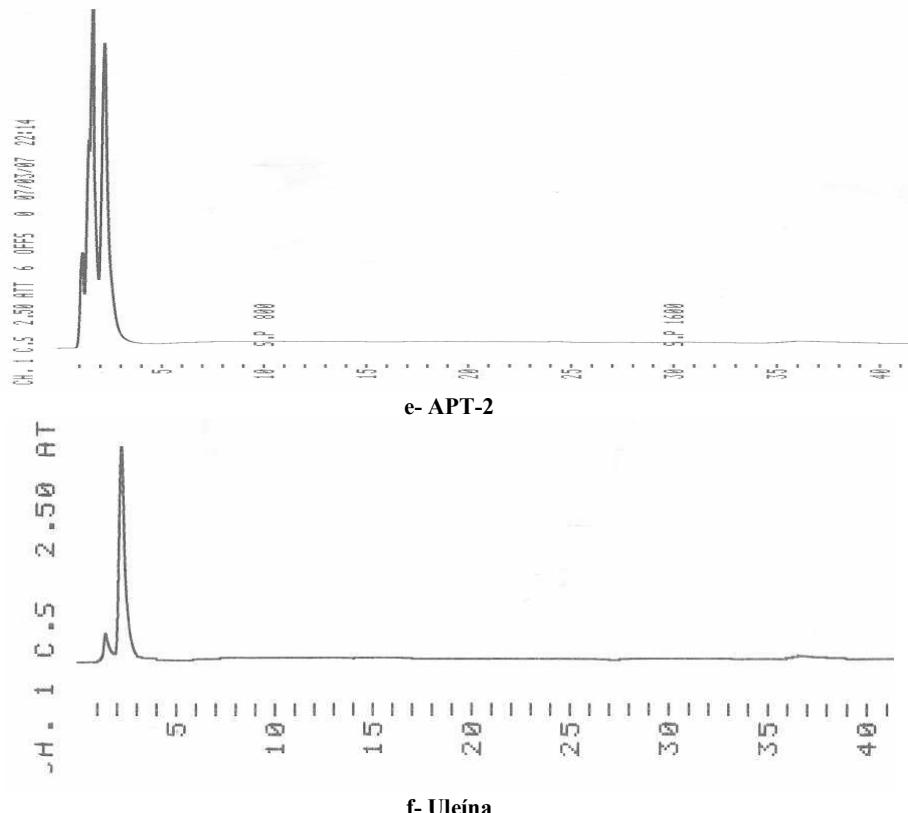


Figura 16: Cromatogramas de extrato etanólico de cascas de *A. parvifolium*, frações e uleína.

Condição: Coluna RP-18; Fase móvel: tampão fosfato pH 2,6 (A): Acetonitrila (B). T= 0 min: 85% A: 15% B; T= 5 min: 80% A: 20% B; T= 30 min: 60% A: 40% B; T= 40 min: 20% A: 80% B; T= 50 min: 85% A: 15% B. Temperatura= 30° C; Fluxo= 1 mL/min; Detecção: λ 300 nm.

Legenda: APN-1- fração de neutros 1; APT-1- fração alcaloidica 1; APN-2- fração de neutros 2 e APT-2- fração alcaloidica 2.

O ETOH-P, APT-1 e uleína (18) foram ainda submetidos à CLAE acoplado a espectrometria de ultra-violeta (DAD). Os perfis cromatográficos e os espectros no UV dos picos principais estão mostrados na Figura 17 (pg. 103). Nestas análises, utilizou-se coluna RP-18, como fase móvel uma solução de ácido orto-fosfórico a 0,1%: acetonitrila, temperatura de 40° C e detecção a λ = 210nm (KEINÄNEN *et al.*, 2001) (Figura 17, pg. 103 e Tabela 13, pg. 104). Na Tabela 13 (pg., 104) estão indicados os TRs dos picos mais intenso (% área \geq 5,0%).

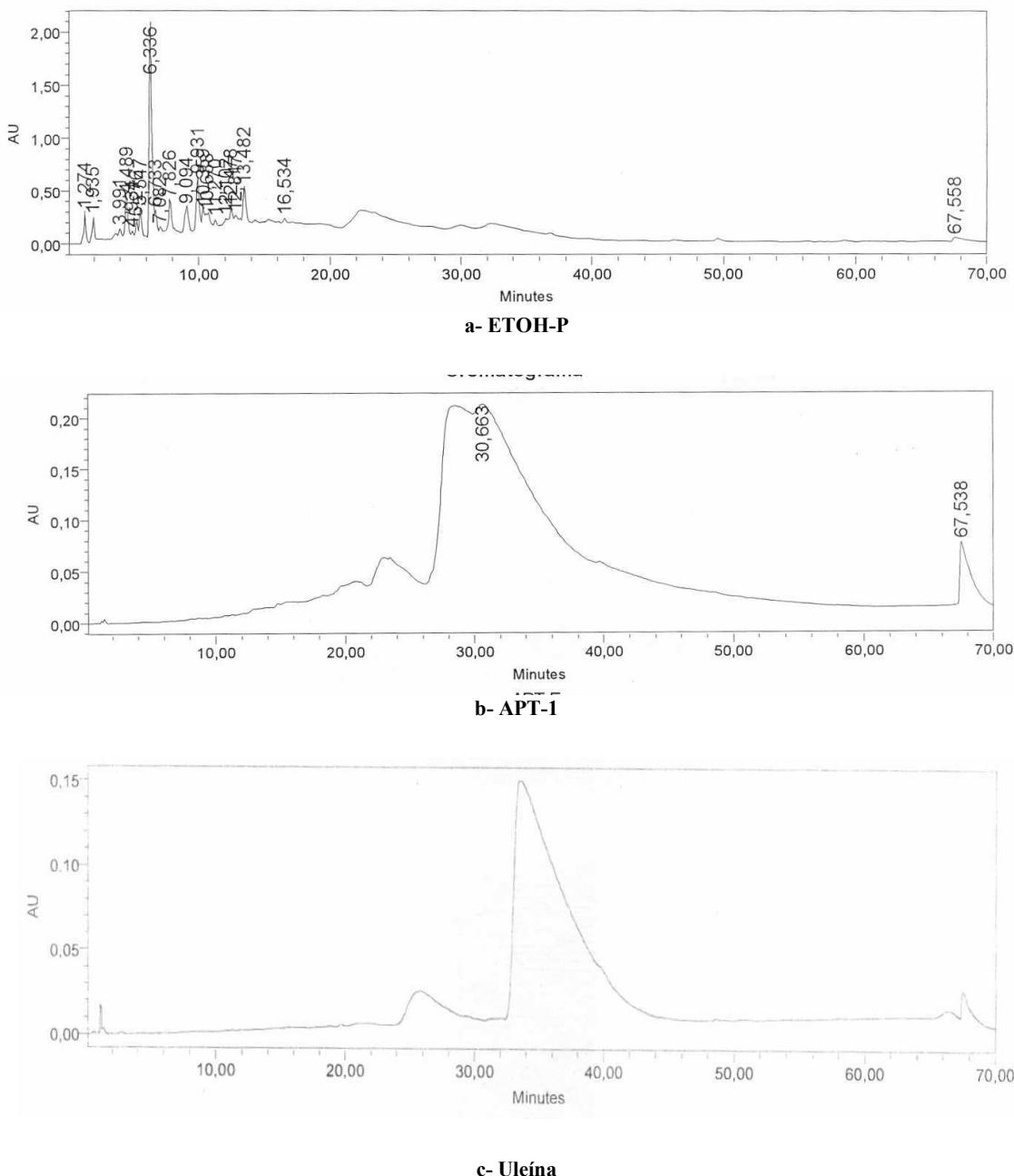


Figura 17: Cromatogramas obtidos na análise em CLAE acoplado a detector com arranjos de diodos (DAD), do extrato etanólico de cascas de *A. pavifolium* (Apocynaceae), APT-1 e uleína. Condição: Coluna RP-18; Eluente gradiente de solução de ácido fosfórico a 0,1% v/v (A) e acetonitrila (b); 0 min 95%A e 5% de B; 60 a 65 min 5% de A e 95% de B; 70 min 95%A e 5% de B. Temperatura: 40º C. Detecção: λ 210nm. Fluxo: 1mL/min por 70 min.

Tabela 13: Análise em cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector com arranjos de diodos (DAD), do extrato etanólico de cascas de *A. parvifolium* (Apocynaceae), APT-1 e uleína.

	TR (min)	% área
ETOH-P	4,489	5,65
	6,336	31,31
	7,826	6,55
	9,094	5,05
	13,482	5,63
APT-1	20,782	8,51
	22,974	7,94
	28,500	22,14
	30,663	58,97
APT-13-16 (8)	25,782	9,15
	33,510	85,21

Condição: Coluna RP-18; Eluente gradiente de solução de ácido fosfórico a 0,1% v/v (A) e acetonitrila (b); 0 min 95%A e 5% de B; 60 a 65 min 5% de A e 95% de B; 70 min 95%A e 5% de B. Temperatura: 40° C. Detecção: λ 210nm. Fluxo: 1mL/min por 70 min.

Legenda: TR= tempo de retenção; ETOH-P: extrato etanólico de cascas de *A. parvifolium*; APT1= fração de alcalóides 1.

6.4.2- Isolamento e identificação da uleína

ETOH-P (Cs) de *A. parvifolium* foi submetido a extração ácido-base sendo obtida a fração alcaloídica (APT1). Desta fração, após cromatografias sucessivas em coluna de Sephadex LH-20 e sílica gel, obtiveram-se duas frações, APT-13-16 (7) e APT-13-16 (8) que apresentaram uma mancha única em CCDS (reveladores: anisaldeído-ácido sulfúrico e reagente de Dragendorff). Comparação com amostra de uleína isolada por Jácome (1998) mostrou tratar-se desta substância. Os cromatogramas por CLAE destas frações confirmaram tratar-se da uleína (Figura 18, pg. 105), sendo observados picos com TRs 2,19 min, para as duas frações e de 2,24 min, para a uleína de referência. Nos três cromatogramas observou-se um pico de um componente minoritário (~10% área relativa), com TR de 1,38 min (Figura 18, pg. 105 e Tabela 14, pg. 105), o qual corresponde, provavelmente, a epiuleína.

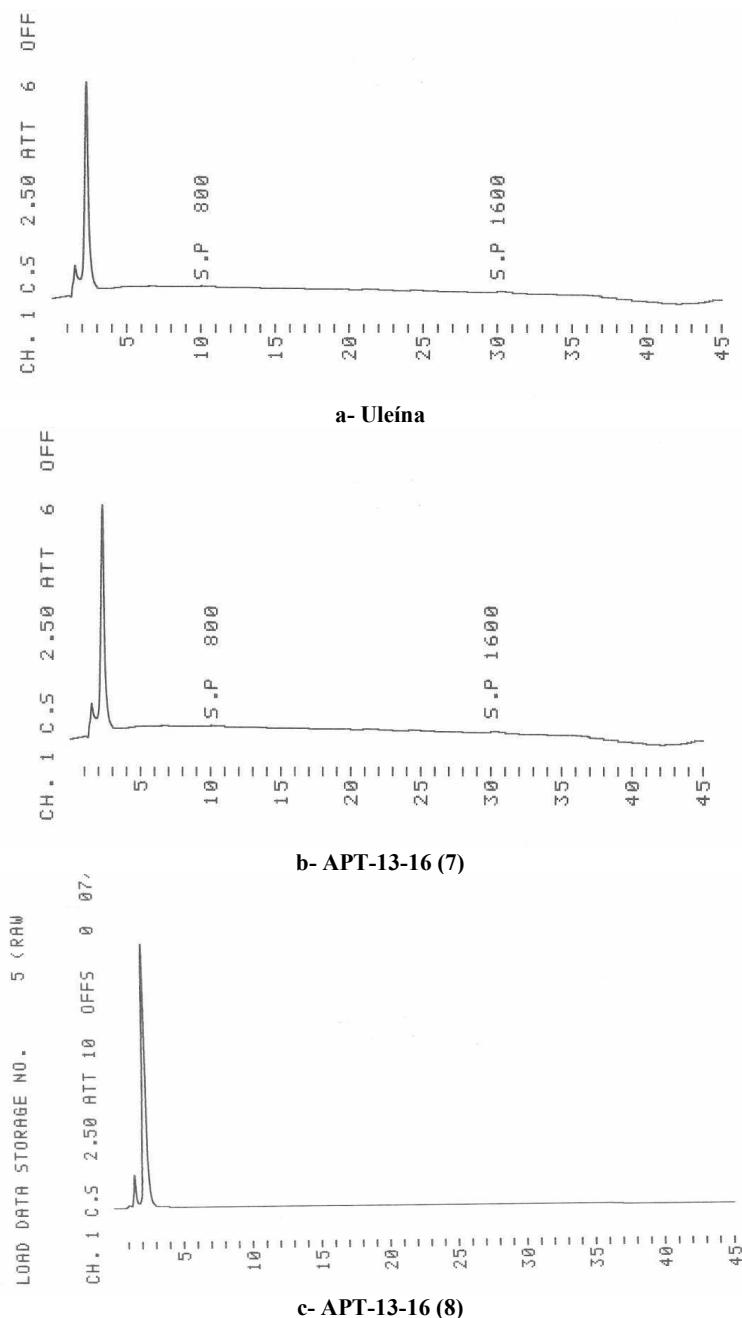


Figura 18: Cromatogramas, obtidos por CLAE, de uleína, APT-13-16 (7) e APT-13-16 (8).

Condições: Coluna RP-18; Fase móvel: tampão fosfato pH 2,6 (A); Acetonitrila (B). T= 0 min: 85% A: 15% B; T= 5 min: 80% A: 20% B; T= 30 min: 60% A: 40% B; T= 40 min: 20% A: 80% B; T= 50 min: 85% A: 15% B. Temperatura= 30° C; Fluxo= 1mL/min; Detecção: λ 300 nm.

Tabela 14: Tempos de retenção da uleína e das frações APT -13-16 (7) e APT- 13-16 (8).

	Uleína	APT- 13-16 (7)	APT- 13-16 (8)
Tempo de retenção (min)	2,24	2,19	2,19

Condições utilizadas para a eluição: Coluna RP-18; Fase móvel: tampão fosfato pH 2,6 (A); Acetonitrila (B). T= 0 min: 85% A: 15% B; T= 5 min: 80% A: 20% B; T= 30 min: 60% A: 40% B; T= 40 min: 20% A: 80% B; T= 50 min: 85% A: 15% B. Temperatura= 30° C; Fluxo= 1mL/min; Detecção: λ 300 nm.

O espectro no IV de APT-13-16 (8) (Figura 19, pg. 106) apresentou absorções correspondentes a deformação axial de ligações N-H (3176 cm^{-1}), estiramento C-H (2931 cm^{-1}), estiramento da ligação C=C em sistema aromático aquela correspondente deformação de quatro hidrogênios adjacentes em anel aromático orto-dissubstituído, no caso o anel indólico (Figura 19, pg. 106). Este espectro mostrou muita semelhança com aquele da uleína (JÁCOME, 1998), como era de se esperar.

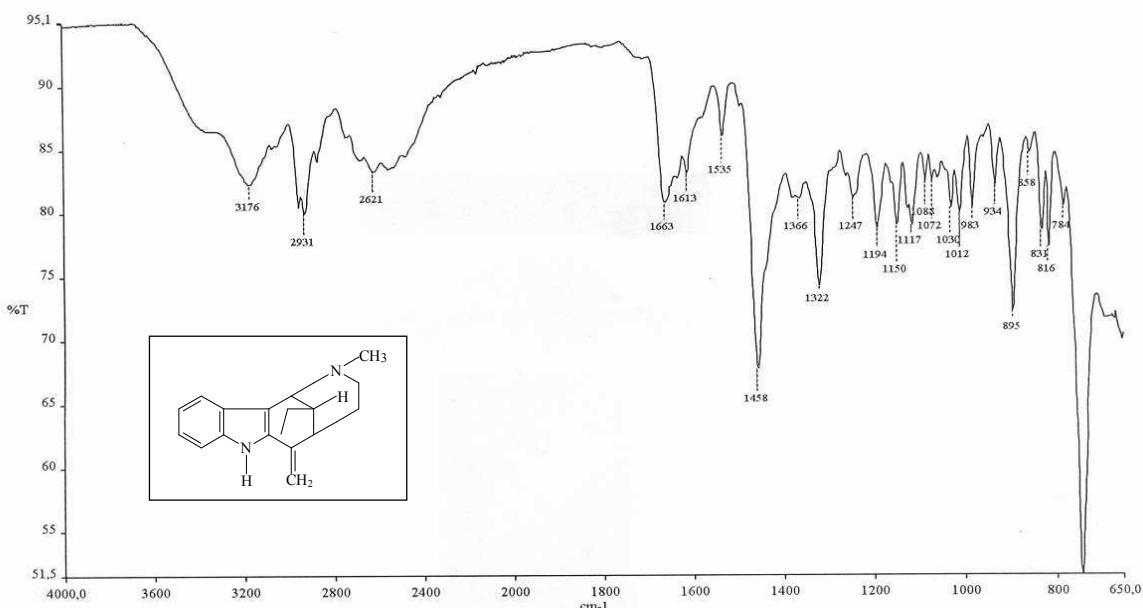


Figura 19: Espectro no IV de APT-13-16 (8).

No espectro no UV (Figura 20, pg. 107), foram observados bandas de absorção nos seguintes λ : 207,3 e 304,2 nm. O λ máximo de absorção em maior comprimento de onda, 304,2 nm, no espectro de APT-13-16 (8) é menor do que aquele da uleína (309nm) o que é explicado pela s utilização de solução de ácido fosfórico 0,1% e acetonitrila como fase móvel (KEINÄNEN *et al.*, 2001), ao invés de água e acetonitrila (JÁCOME, 1998).

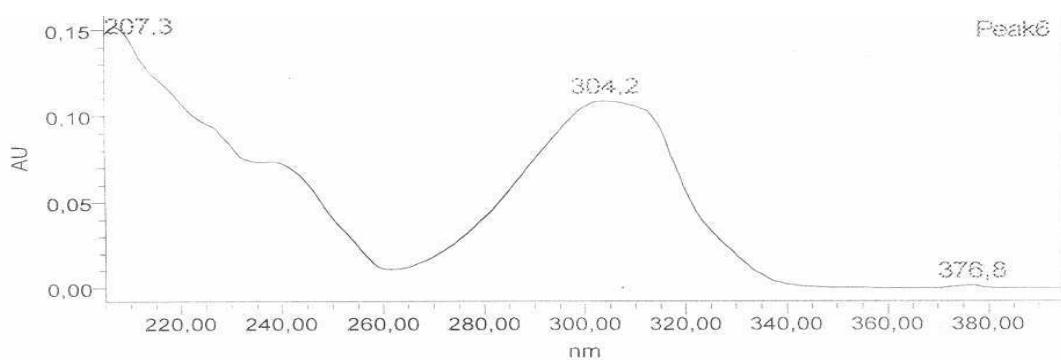


Figura 20: Espectro no UV de APT-13-16 (8), obtido em CLAE acoplado a detector com arranjos de diodos (DAD).

Condição: Coluna RP-18; Eluente gradiente de solução de ácido fosfórico a 0,1% v/v (A) e acetonitrila (b); 0 min 95% A e 5% de B; 60 a 65 min 5% de A e 95% de B; 70 min 95% A e 5% de B. Temperatura: 40º C. Detecção: λ 210nm. Fluxo: 1 mL/min por 70 min.

O espectro de massa de APT-13-16 (8) apresentou o íon molecular esperado, em m/z 266, devendo corresponder à uléína, com os principais fragmentos m/z 237, 223, 209, 194 e 180u, conforme proposta de Manske e Rodrigo (1965) (Figura 21, pg. 107 e Figura 22, pg. 108).

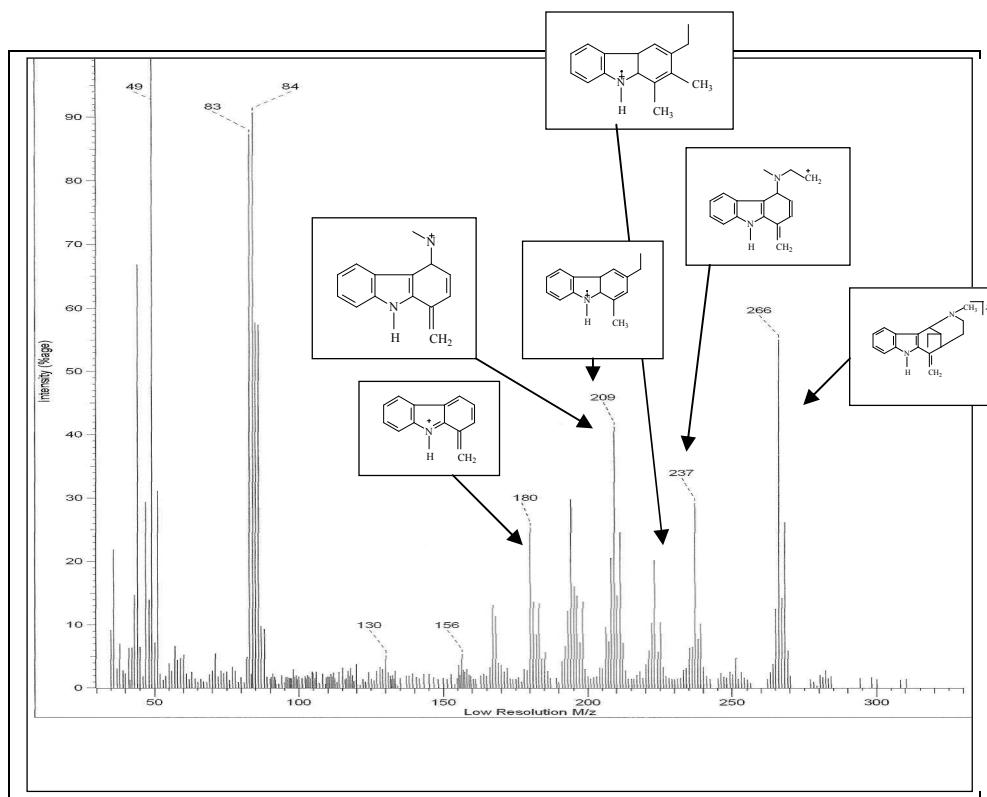


Figura 21: Espectro de massa por impacto eletrônico de APT-13-16 (8).
Fonte: Jacome, 1998

Visando concluir a identificação estrutural da substância APT-13-16 (8) foram realizadas análises em Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN¹H) e de carbono – 13 (RMN¹³C) e os resultados obtidos foram comparados aos resultados de Jácome (1998) confirmando tratar-se de uma mistura contendo predominantemente a uleína e baixo percentual de epiuleína.

6.4.3- Atividade antiplasmódica do extrato etanólico de cascas de *A. parvifolium*, frações e APT 13-16 (8) (uleína) pelos métodos tradicional (RIECKMAN *et al.*, 1978 modificado por CARVALHO, 1990) e radioisotópico (DESJARDINS *et al.*, 1979)

No clone W2, ETOH-P (Cs) de *A. parvifolium* e APN-1 mostraram-se moderadamente ativos, CI₅₀ 32,75 ± 1,06 e 15,02 ± 2,83 µg/mL, respectivamente. As outras frações e APT13-16 (8) / uleína (18) mostraram-se ativas (CI₅₀ < 10 µg/mL). No clone 3d7, o extrato etanólico e as frações de neutros (APN-1 e APN-2) apresentaram atividade antiplasmódica moderada, já as frações alcaloídicas (APT-1 e APT-2) e APT13-16 (8) / uleína (18) foram ativas (CI₅₀ < 10 µg/mL). Todas as amostras avaliadas foram menos potentes que a cloroquina e a mefloquina (Tabela 15, pg.108).

Tabela 15: Atividade antiplasmódica, *in vitro*, pelo método tradicional, do extrato etanólico de cascas de *A. parvifolium*, frações e APT-13-16 (8) (uleína).

	W2		3d7	
	CI ₅₀ (µg/mL)± DP	CI ₉₀ (µg/mL)± DP	CI ₅₀ (µg/mL)± DP	CI ₉₀ (µg/mL)± DP
Cloroquina	0,02 ± 0,002	ND	0,0013 ± 0,0001	0,0020 ± 0,0001
Mefloquina	0,0165±0,002	0,0895±0,002	0,048 ± 0,0007	0,0975±0,0007
ETOH-P (Cs)	32,75 ± 1,06	74,50 ± 1,34	20,51 ± 0,70	38,00 ± 4,26
APN-1	15,02 ± 2,83	60,02 ± 1,56	17,75 ± 0,35	31,50 ± 1,06
APN-2	9,75 ± 0,35	24,25 ± 1,06	10,50 ± 0,35	20,75 ± 0,35
APT-1	0,98 ± 0,20	4,05 ± 0,20	7,63 ± 0,31	15,02 ± 2,80
APT-2	1,25 ± 0,35	6,25 ± 0,76	2,45 ± 1,55	8,50 ± 0,71
APT13-16 (8) / uleína (18)	0,75 ± 0,10	1,91 ± 0,10	11,90 ± 0,10	23,25 ± 2,50

Legenda: clone W2- resistente a cloroquina e sensível a mefloquina; clone 3d7- sensível a cloroquina; CI₅₀- concentração inibitória 50%; DP- desvio padrão; ETOH-P: extrato etanólico de cascas de *A. parvifolium* obtido por percolação; APN-1- fração de neutros 1 (Figura 8, pg. 73); APN-2- fração de neutros 2 (Figura 9, pg. 74); APT-1- fração de alcaloides totais 1 (Figura 8, pg. 73); APT-2- fração de alcaloides totais 2 (Figura 9, pg. 74).

Além da avaliação da atividade antiplasmódica pelo método tradicional (RIECKMAN *et al.*, 1978 modificado por CARVALHO, 1990), o ETOH-P (Cs) de *A. parvifolium* e frações (APN-1; APN-2; APT-1 e APT-2) foram submetidos ao ensaio radioistópico em que a atividade antiplasmódica foi determinada através da capacidade do parasito de incorporar a hipoxantina tritiada, [8³-H]- hipoxantina (DESJARDINS *et al.*, 1979). Os resultados obtidos nestas determinações encontram-se na Tabela 16 (pg. 109).

O ETOH-P (Cs) de *A. parvifolium* e APN-1 mostraram atividade antiplasmódica moderada para os clones W2 e 3d7. As demais frações apresentaram atividade moderada em 3d7 e mostraram-se ativas em W2 (Tabela 16, pg.109).

Tabela 16: Avaliação da atividade antiplasmódica, *in vitro*, pelo método radioisotópico, do extrato etanólico de cascas de *A. parvifolium* e frações.

	CI ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$) \pm SD	
	W2	3d7
Cloroquina	0,018 \pm 0,0005	0,002 \pm 0,0004
Mefloquina	0,044 \pm 0,0077	0,052 \pm 0,0056
ETOH-P (Cs)	42,51 \pm 6,33	38,20 \pm 0,33
APN-1	38,02 \pm 3,76	18,2 \pm 1,75
APN-2	4,5 \pm 0,45	33,25 \pm 3,29
APT-1	8,0 \pm 1,19	43,05 \pm 4,30
APT-2	5,6 \pm 0,83	ND

Legenda: clone W2- resistente a cloroquina e sensível a mefloquina; clone 3d7- sensível a cloroquina; CI₅₀- concentração inibitória 50%; DP- desvio padrão; ETOH-P: extrato etanólico de cascas de *A. parvifolium* obtido por percolação; APN-1- fração de neutros 1 (Figura 8, pg. 73); APN-2- fração de neutros 2 (Figura 9, pg. 74); APT-1- fração de alcalóides totais 1 (Figura 8, pg. 73); APT-2- fração de alcalóides totais 2 (Figura 9, pg. 74); ND- não determinado.

6.4.4- Citotoxicidade em células VERO, pelo método do MTT (TWENTNAN e LUSCOMBE, 1987) de extrato etanólico de cascas de *A. parvifolium*, frações e APT-13-16 (8) (uleína) e índice de seletividade (IS)

Além da atividade antiplasmódica, foi avaliada a citotoxicidade do ETOH-P (Cs) *A. parvifolium*, frações (APN-1 e APT-1) e uleína, em células VERO (Tabela 17, pg. 110). O ETOH-P (Cs) mostrou-se pouco tóxico para células VERO (CC₅₀> 500 $\mu\text{g/mL}$), enquanto que as frações e a APT13-16 (8) / uleína (18) mostraram uma citotoxicidade moderada (100 < CC₅₀ < 500 $\mu\text{g/mL}$). Quando se determinou o IS utilizando-se as CI₅₀ obtidas para o clone

W2 (Tabela 15, pg. 108) observou-se que, quanto mais pura a amostra, maior seu índice de seletividade, isto é, a uleína apresentou IS mais alto do que o extrato e as frações APN-1 e APT-1. Porém quando se utilizam os resultados obtidos com o clone 3d7 (Tabela 15, pg. 108), as alterações nos IS são discretas e menos favoráveis (Tabela 17, pg.110).

Tabela 17: Citotoxicidade e índice de seletividade de extrato etanólico de cascas de *Aspidosperma parvifolium*, frações e APT 13-16 (8) /uleína.

	CC ₅₀ (μg/mL)	IS (W2)	IS (3d7)
ETOH-P (Cs)	>500	>15,27	>24,38
APN-1	449,3	29,91	25,31
APT-1	299,7	305,82	39,28
APT 13-16 (8) /uleína (18)	374,6	500,00	31,47

Legenda: CC₅₀- concentração inibitória 50%; IS- índice de seletividade; APN- 1- fração de neutros 1 (Figura 8, pg. 73) e APT-1- fração de alcalóides totais 1 (Figura 8, pg. 73).

6.5- *Esenbeckia febrífuga*: fracionamento do extrato etanólico de caules, caracterização fitoquímica, atividade antiplasmódica, citotoxicidade e índices de seletividade

6.5.1- Fracionamento do extrato etanólico de caules

Ao ETOH-P (Ca) de *E. febrífuga* (97,1 g) adicionou-se etanol (50 mL) e HCl 1 N (150 mL). Homogeneizou-se e extraiu-se com diclorometano (150 mL/ 3x) separando-se uma camada de diclorometano (EFN, *E. febrífuga* neutros), uma camada aquosa ácida (EFA-1, *E. febrífuga* aquosa ácida 1) e uma camada intermediária (EFI-1, *E. febrífuga* intermediária 1). EFA-1 foi alcalinizada com NH₄OH até pH 9 e extraiu-se com diclorometano, obtendo-se, novamente, três frações: diclorometano (EFT, *E. febrífuga* alcalóides totais); aquosa alcalina (EFAA, *E. febrífuga* aquosa alcalina) e intermediária (EFI-2, *Esenbeckia febrífuga* intermediária -2) (Figura 9, pg. 74). A Tabela 18 (pg.111) mostra os rendimentos obtidos.

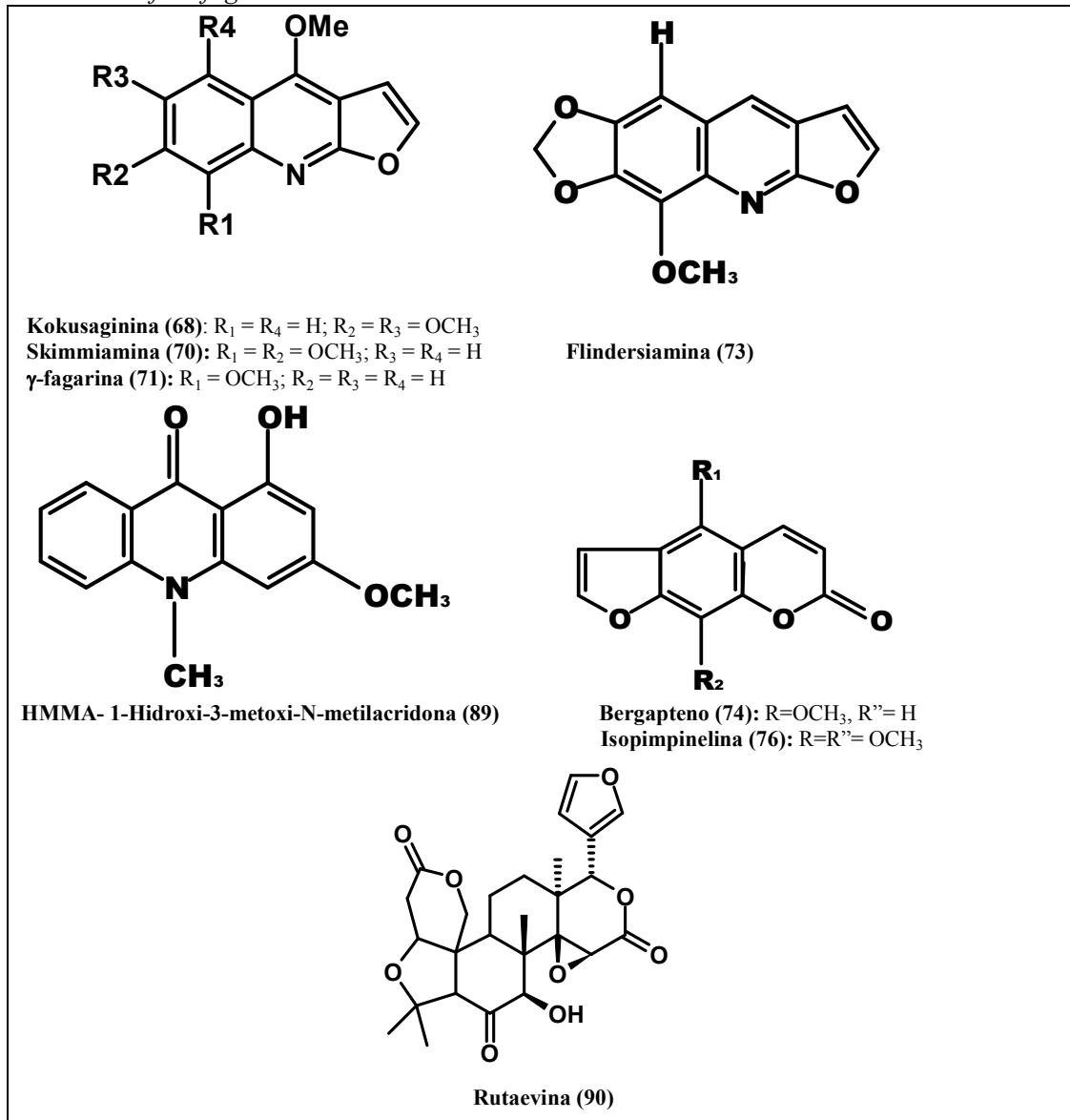
Tabela 18: Rendimento da extração ácido-base a partir do extrato etanólico de caules de *Esenbeckia febrifuga*.

	Caules Extrato(g)	Rendimento
ETOH-P (Ca)	97,10	
EFN	7,73	8,0%
EFI-1	1,78	1,8%
EFT	9,78	10,1%
EFI-2	1,46	1,5%
EFAA	76,30	78,5%
Total	97,06	99,9%

Legenda: ETOH-P (Ca): extrato etanólico de caules de *E. febrifuga* obtido por percolação; EFN: *E. febrifuga* neutros; EFI-1: *E. febrifuga* intermediária 1; EFT: *E. febrifuga* alcaloides totais; EFAA: *E. febrifuga* aquosa alcalina e EFI-2: *E. febrifuga* intermediária 2.

O ETOH-P (Ca) foi submetido a estudo fitoquímico na Fakultät für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität, Munique, Alemanha, pelo grupo do Prof. Dr. Hildebert Wagner, no âmbito de Projeto de Cooperação Internacional apoiado pelo convênio CNPq/ DLR (Alemanha). Foram isoladas e identificadas 8 substâncias: kokusaginina (68), skimmiamina (70), γ - fagarina (71), flindersiamina (73), 1-hidroxi-3-metoxi-N-metilacridona (HMMA) (89), bergapteno (74), isopimpinelina (76) e rutaevina (90) (Quadro 16, pg. 112) (Anexo 2, 162, DOLABELA *et al.*, 2007).

Quadro 16: Estruturas químicas das substâncias isoladas do extrato etanólico de caules de *Esenbeckia febrifuga*.



Fonte: DOLABELA *et al.*, 2007

6.5.2- Caracterização fitoquímica: análises em cromatografia em camada delgada de sílica gel e cromatografia líquida de alta eficiência do ETOH-P (Ca) de *E. febrifuga*, frações e substâncias isoladas

O extrato e frações resultantes dos processos extractivos foram submetidos à prospecção fitoquímica, em CCDS (Tabela 19, pg. 113 e Figura 22, pg. 113- 114). Os alcalóides, rutaevina, bergapteno e isopimpinelina foram utilizados como substâncias de referência nas análises em CCDS e CLAE. Nas análises em CLAE, utilizaram-se duas diferentes fases móveis e os resultados estão mostrados na Tabela 19 (pg. 113) e Figura 22 (pg. 113-114).

Tabela 19: Prospecção fitoquímica por CCDS e análises em CLAE do extrato etanólico de *E. febrifuga*, frações e susbtâncias.

	CCDS (Tabela 3, pg.75)	CLAE: TR (min)	
		C1	C2
ETOH-P (Ca)	S, T, E, C e F	5,5- HMMA 12,27- Isopimpinelina	18,98- Skimmiamina 23,47- Flindersiamina 32,19- HMMA
EFN (Ca)	S e C	12,24 Isopimpinelina	18,98- Skimmiamina 19,74- Rutaevina 23,44- Flindersiamina 32,22- HMMA
EFT (Ca)	S e C	2,68- Skimmiamina 12,18 Isopimpinelina 15,90- Rutaevina	18,83- Skimmiamina 23,36- Flindersiamina 32,03- HMMA
Skimmiamina (70)	-	2,59	18,36
Flindersiamina (73)	-	4,26	23,36
HMMA (89)	-	5,43	32,72
Bergapteno (74)	-	16,58	19,67
Isopimpinelina (76)	-	12,40	-
Rutaevina (90)	-	16,06	19,22

Condição 1 (C1): Coluna RP-18; Fase móvel: agua (A): Acetonitrila (B). T= 0 min: 85% A: 15% B; T= 5 min: 80% A: 20% B; T= 30 min: 60% A: 40% B; T= 40 min: 20% A: 80% B; T= 50 min: 85% A: 15% B. Temperatura= 30° C; Fluxo= 1 mL/min; comprimento de onda 210 nm.

Condição 2 (C2): Coluna RP-18; Fase móvel: tampão fosfato pH 2,6 (A): Acetonitrila (B). T= 0 min: 85% A: 15% B; T= 5 min: 80% A: 20% B; T= 30 min: 60% A: 40% B; T= 40 min: 20% A: 80% B; T= 50 min: 85% A: 15% B. Temperatura= 30° C; Fluxo= 1 mL/min; comprimento de onda 210 nm.

Legenda: ETOH-P (Ca): extrato etanólico de caules de *E. febrifuga* obtido por percolação; EFN- *E. febrifuga* neutros; EFT- *E. febrifuga* alcalóides totais; HMMA- 1-Hidroxi-3-metoxi-N-metilacridona.

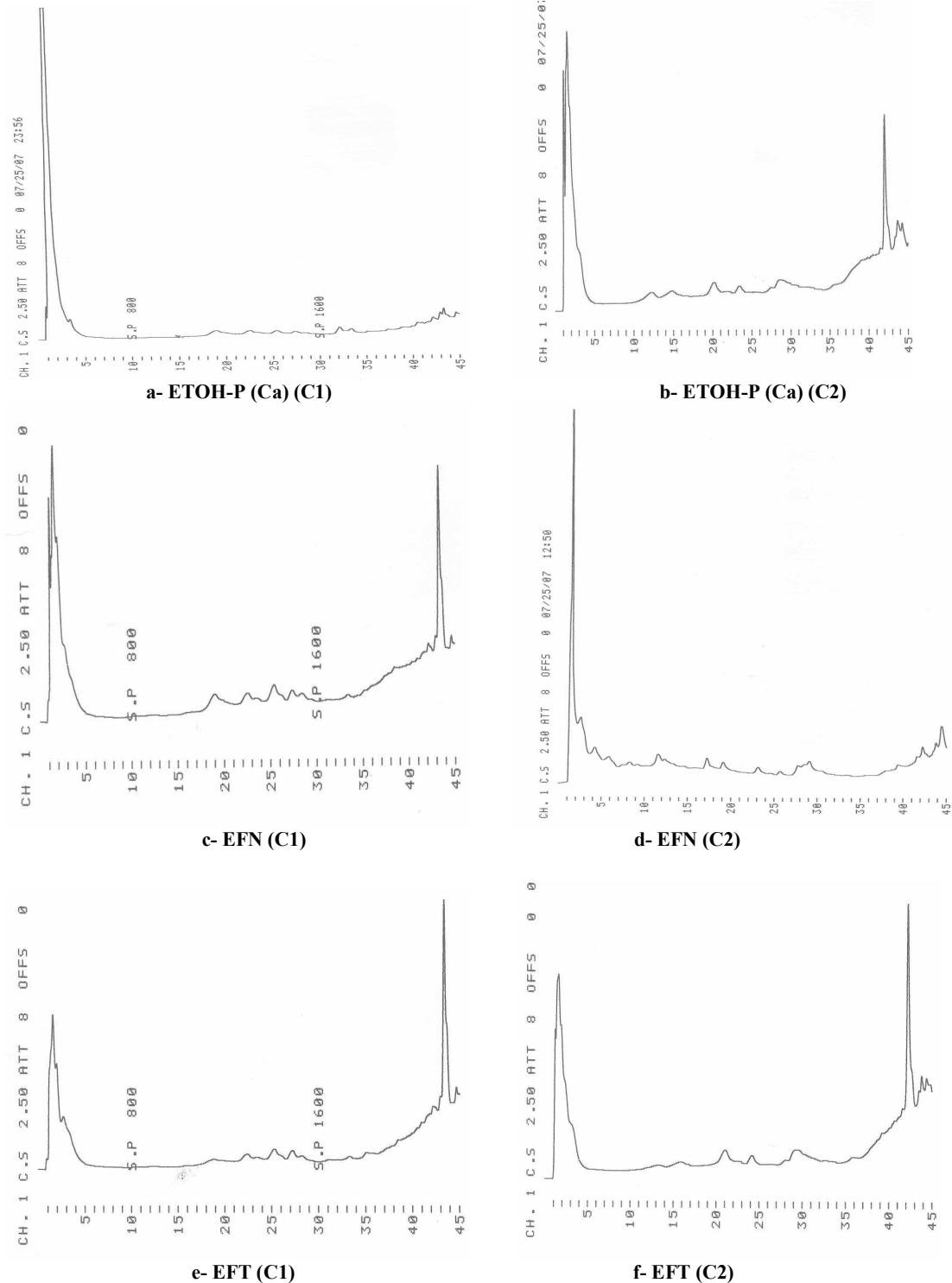


Figura 22: Perfis cromatográficos, obtidos por CLAE, do extrato etanólico de caules de *E. febrifuga* e frações.

Condição 1 (C1): Coluna RP-18; Fase móvel: agua (A): Acetonitrila (B). Fase móvel: agua (A): Acetonitrila (B). T= 0 min: 90% A: 10% B; T= 60 min: 20% A: 80% B; T= 70 min: 90% A: 10% B. Temperatura= 30º C; Fluxo= 1 ml/min; comprimento de onda 210 nm.

Condição 2 (C2): Coluna RP-18; Fase móvel: tampão fosfato pH 2,6 (A): Acetonitrila (B). T= 0 min: 85% A: 15% B; T= 5 min: 80% A: 20% B; T= 30 min: 60% A: 40% B; T= 40 min: 20% A: 80% B; T= 50 min: 85% A: 15% B. Temperatura= 30º C; Fluxo= 1 mL/min; comprimento de onda 210 nm.

Legenda: EFN- *E. febrifuga* neutros e EFT- *E. febrifuga* alcalóides totais.

6.5.3- Atividade antiplasmódica, citotoxicidade e índices de seletividade do extrato etanólico de *E. febrifuga*, frações e substâncias isoladas

O extrato etanólico de caules de *E. febrifuga* mostrou-se moderadamente ativo nos clones W2 e 3d7. O processo extrativo ao qual foi submetido este extrato não contribuiu para a melhoria na atividade antiplasmódica, visto que, as frações obtidas tiveram CI₅₀ um pouco mais elevadas que a do extrato. As substâncias puras obtidas foram moderamente ativas (γ -fagarina e skimmiamina) e inativas (rutaevina e 1-HMMA). A flindersiamina foi inativa para 3d7 e sua CI₅₀ para W2 foi próxima à faixa considerada inativa. Todas as amostras apresentaram atividade antiplasmódica inferior a cloroquina e mefloquina (Tabela 20, pg. 115).

Tabela 20: Atividade antiplasmódica, *in vitro*, através do método tradicional, do extrato etanólico de caules de *E. febrifuga*, frações e substâncias isoladas.

	W2		3d7	
	CI ₅₀ (μg/mL) ± DP	CI ₉₀ (μg/mL) ± DP	CI ₅₀ (μg/mL) ± DP	CI ₉₀ (μg/mL) ± DP
Cloroquina	0,02 ± 0,002	ND	0,0013 ± 0,0001	0,0020 ± 0,0001
Mefloquina	0,0165 ± 0,002	0,0895 ± 0,002	0,048 ± 0,0007	0,0975 ± 0,0007
ETOH- Ca	15,5 ± 0,71	26,5 ± 0,71	21,0 ± 1,41	38,01 ± 2,80
EFN	26,5 ± 0,70	47,5 ± 9,1	ND	ND
EFT	30,5 ± 2,12	70,0 ± 1,40	34,5 ± 3,5	78,0 ± 8,5
Flindersiamina	95,0 ± 4,21	>100	>100	>100
Skimmiamina	19,5 ± 0,71	33,5 ± 0,71	43,0 ± 1,41	>100
HMMA	>100	ND	>100	ND
γ -Fagarina	36,0 ± 2,8	87,5 ± 1,9	25,0 ± 4,2	49,5 ± 12,2
Rutaevina	>100	ND	>100	ND

Legenda: W2- resistente a cloroquina e sensível a mefloquina; 3d7- sensível a cloroquina; CI₅₀- concentração inibitória 50%; DP- desvio padrão; ETOH-P (Ca): extrato etanólico de caules de *E. febrifuga* obtido por percolação; EFN- *E. febrifuga* neutros; EFT- *E. febrifuga* alcalóides totais; HMMA- 1-Hidroxi-3-metoxi-N-metilacridona; ND- não determinado.

O ETOH- P (Ca) de *E. febrifuga*, frações e algumas das substâncias isoladas foram submetidos a ensaios, *in vitro*, para atividade antiplasmódica utilizando a [8-³H] - hipoxantina (DESJARDINS *et al.*, 1979) (Tabela 21, pg. 115).

Tabela 21: Atividade antiplasmódica, *in vitro*, pelo método radioisotópico, do extrato etanólico de caules de *E. febrifuga*, frações e substâncias isoladas.

	[8- ³ H]-Hipoxantina	
	W2	3d7
	CI ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{mL}$) \pm DP	CI ₉₀ ($\mu\text{g}/\text{mL}$) \pm DP
Cloroquina	0,018 \pm 0,0005	0,002 \pm 0,0004
Mefloquina	0,044 \pm 0,0077	0,052 \pm 0,0056
ETOH-P (Ca)	21,75 \pm 2,29	38,01 \pm 2,80
EFN	49,20 \pm 4,09	29,60 \pm 4,15
EFT	34,5 \pm 3,5	39,50 \pm 5,63
Flindersiamina	ND	68,01 \pm 8,68
Skimmiamina	ND	54,10 \pm 5,26

Legenda: W2- resistente a cloroquina e sensível a mefloquina; 3d7- sensível a cloroquina; CI₅₀- concentração inibitória 50%; DP- desvio padrão; ETOH-P (Ca): extrato etanólico de caules de *E. febrifuga* obtido por percolação; EFN- *E. febrifuga* neutros e EFT- *E. febrifuga* alcalóides totais, ND- não determinado.

Além da avaliação da atividade antiplasmódica, o ETOH-P (Ca) de *E. febrifuga* e frações foram submetidos a ensaio de citotoxicidade em células VERO, sendo determinada a CC₅₀, e a partir da divisão da CC₅₀ pela CI₅₀, foram calculados os índices de seletividade (Tabela 22, pg. 116).

Tabela 22: Citotoxicidade e índice de seletividade de extrato etanólico de caules de *E. febrifuga* e frações.

	CC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	IS (W2)	IS (3d7)
ETOH-P (Ca)	> 500	32,3	>23,8
EFN	364,9	23,5	ND
EFT	171,3	5,6	4,9

Legenda: W2- resistente a cloroquina e sensível a mefloquina; 3d7- sensível a cloroquina; CC₅₀- Concentração citotóxica 50%, IS- índice de seletividade e ND- não determinado.

7- DISCUSSÃO

7.1- Comparação dos resultados obtidos para atividade antiplasmódica da cloroquina e mefloquina com os dados da literatura

Para avaliação da atividade antiplasmódica dos extratos/frações/substâncias utilizaram-se como antimaláricos de referência, difosfato de cloroquina e a mefloquina, sendo calculadas as CI_{50} destas drogas para os clones W2 e 3d7. Visando avaliar a influência dos materiais e métodos utilizados no trabalho e o cálculo das CI_{50} , compararam-se estes resultados aos descritos na literatura (MACKINNON *et al.*, 1997; KAPADIA *et al.*, 2001 e ANDRADE NETO *et al.*, 2007), sendo observado que as CI_{50} obtidas foram próximas às descritas na literatura. Por não ter sido encontrado na literatura CI_{50} para o clone 3d7, comparou-se sua CI_{50} àquele de outro clone sensível a cloroquina (D6). De modo geral, as CI_{50} obtidas neste trabalho estão na mesma faixa daquelas descritas na literatura (Tabela 23, pg. 117).

As pequenas diferenças observadas nos valores das CI_{50} podem estar relacionadas às diferenças metodológicas (tradicional e radioisotópica), às diferenças entre os profissionais que realizam os ensaios e, ainda, às diferenças relacionadas aos equipamentos e outros produtos utilizados.

Tabela 23: Atividade antiplasmódica da cloroquina e mefloquina pelos métodos tradicionais e radioisotópico encontradas no presente trabalho e descritas na literatura.

Substâncias (nº estrutura)	Clone	Tradicional- CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	Radioisotópico CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	Referência
Cloroquina (3)	W2	0,023	0,018	Nesta tese
	3d7	0,0013	0,0020	Nesta tese
Mefloquina (2)	W2	0,0165	0,044	Nesta tese
	3d7	0,048	0,052	Nesta tese
Cloroquina(3)	K1	0,46	-	ANDRADE NETO <i>et al.</i> , 2007.
Cloroquina (3)	W2	-	0,0295	MACKINNON <i>et al.</i> , 1997
Cloroquina (3)	D6	-	0,0013	MACKINNON <i>et al.</i> , 1997
Mefloquina (2)	W2	-	0,0014	MACKINNON <i>et al.</i> , 1997
Mefloquina (2)	D6	-	0,0075	MACKINNON <i>et al.</i> , 1997
Cloroquina (3)	W2		0,012	KAPADIA <i>et al.</i> , 2001
Cloroquina (3)	D6		0,0046	KAPADIA <i>et al.</i> , 2001

Legenda: clone W2: resistente a cloroquina e sensível a mefloquina; Clone 3d7: sensível a cloroquina; clone D6: sensível a cloroquina e resistente a mefloquina; CI_{50} - concentração inibitória 50%

7.2- Relação entre dados obtidos da literatura e os resultados obtidos para

7.2.1- *Aspidosperma cylindrocarpon*

De *A. cylindrocarpon* já foram isolados vários alcalóides indólicos (Tabela 1, pg. 61 e Quadro 10, pg. 48), sendo sua presença no extrato ETOH-P (Ca-Fo) confirmada em CCDS e em CLAE. Esperava-se, em CLAE observar vários picos relacionados aos alcalóides, porém isso não ocorreu. Sabe-se que os alcalóides desta planta são estruturalmente semelhantes (MANSKE e RODRIGO, 1965) e por isso, podem possuir tempos de retenção semelhantes e haver sobreposição dos picos (Anexo 1, pg. 153).

A atividade antiplasmódica de ETOH-P (Ca-Fo) de *A. cylindrocarpon* foi moderada (CI_{50} entre 10 a 100 $\mu\text{g/mL}$) para os clones W2 e 3d7 (Tabelas 9, pg. 96 e Tabela 24, pg. 119). O ETOH-P (Ca-Fo) de *A. cylindrocarpon* pode conter uma concentração de alcalóides intermediária, visto que nas folhas, em geral, o teor de alcalóides é baixo, já nas cascas do caule o teor de alcalóides é mais elevado (SCHRIJPEMA *et al.*, 1999).

Apesar ETOH-P (Ca-Fo) de *A. cylindrocarpon* possuir baixa citotoxicidade ($CC_{50} > 500 \mu\text{g/mL}$), seu índice de seletividade é baixo (Tabela 10, pg. 98 e Tabela 24, pg. 118).

Tabela 24: Correlação entre os resultados obtidos em CCDS, CLAE e atividade antiplasmódica de *A. cylindrocarpon*.

Extrato	Alcalóides		Atividade antiplasmódica	
	CCDS	CLAE (pico e TR)*	W2	3d7
ETOH-P (Ca-Fo)	+	2 intensos, TR= 1,46 e 1,58 min	Moderada	moderada

Legenda: CCDS- cromatografia em camada delgada de sílica gel; CLAE- cromatografia líquida de alta eficiência; W2- clone resistente a cloroquina e sensível a mefloquina; 3d7- clone sensível a cloroquina; + positivo.

Condição 1- Coluna RP-18; Fase móvel: tampão fosfato pH 2,6 (A): Acetonitrila (B); T= 0 min: 85% A: 15% B; T= 5 min: 80% A: 20% B; T= 30 min: 60% A: 40% B; T= 40 min: 20% A: 80% B; T= 50 min: 85% A: 15% B. Temperatura= 30° C; Fluxo= 1 mL/min; comprimento de onda 300 nm.

Condição 2- Coluna RP-18; Fase móvel: tampão fosfato pH 2,6 + 2,5 mM de sal sódico de ácido hexanossulfônico (A): Acetonitrila (B). T= 0 min: 85% A: 15% B; T= 5 min: 80% A: 20% B; T= 30 min: 60% A: 40% B; T= 40 min: 20% A: 80% B; T= 50 min: 85% A: 15% B. Temperatura= 30° C; Fluxo= 1 mL/min; comprimento de onda 300 nm.

*- Tabela 8 (pg. 94) e Anexo 1 (pg. 153)

7.2.2- *Aspidosperma olivaceum*

A. olivaceum já foram isolados uleína (18), epiuleína (19), olivacina (59), elipticina (17), aparicina (39) e aspidoscarpina (28) (GILBERT *et al.*, 1965) (Tabela 1, pg.61 e Quadro 11, pg. 49). Portanto, esperava-se observar nos cromatogramas, obtidos por CLAE de extratos desta planta, vários picos relacionados a alcalóides, o que, entretanto não ocorreu (ANEXO 1, pg.154 e Tabela 8, pg. 94). Provavelmente, esteja ocorrendo à superposição de picos, o que pode estar relacionado às similaridades entre as estruturas químicas (epiuleína e uleína são isômeros e olivacina e elipticina também são isômeros).

Os resultados obtidos em CCDS, CLAE e microteste foram correlacionados (Tabela 25, pg. 120). Os extratos que revelaram positivamente para alcalóides em CCDS apresentaram picos intensos em CLAE, provavelmente relacionados aos alcalóides, e mostraram-se muito ativos no microteste tradicional (W2 e 3d7). Extratos que não revelaram em CCDS, mostraram picos de baixa intensidade em CLAE e mostraram menor atividade antiplasmódica, exceto ETOH- S (Fo). Estes resultados sugerem que a atividade antiplasmódica deve estar relacionada aos alcalóides, pois quanto mais intenso(s) o(s) pico(s) relacionado(s) aos alcalóides de maior a atividade (Tabela 25, pg. 119 e Anexo 1, pg.154). A atividade antiplasmódica de alcalóides presentes em *A. olivaceum*, elipticina (17) e aspidoscarpina (28), já foram recentemente descritas (ANDRADE-NETTO *et al.*, 2007). Também a citotoxicidade de elipticina (17) e olivacina (59) tem sido relatada e a questão do IS será melhor discutida no item 7.3.

Outro alcalóide que pode estar presente em extratos de *A. olivaceum* e cuja atividade antiplasmódica foi demonstrada neste trabalho, é a uleína. Em síntese, esta atividade dos extratos de *A. olivaceum* deve estar relacionada à presença de mais de um alcalóide indólico.

Tabela 25: Correlação entre os resultados obtidos em CCDS, CLAE e atividade antiplasmódica de *A. olivaceum*.

Extratos	Alcalóides		Atividade antiplasmódica	
	CCDS	CLAE (pico)*	W2	3d7
DCL-S(Fo)	-	2 Reduzido, TR= 1,20 e 2,36 min	Moderada	Ativo
ETOH- S (Fo)	-	1 Reduzido, TR= 1,15 min	Ativo	Ativo
DCL-S (Ca)	+	2 Intenso, TR= 1,30 e 2,24 min	Ativo	Ativo
DCL-S (Cs)	+	2 Intenso, TR= 1,30 e 2,24 min	Ativo	Ativo
ETOH-S (Cs)	+	2 Intenso, TR= 1,05 e 2,10 min	Ativo	Ativo

Lenda: CCDS- cromatografia em camada delgada de sílica gel; CLAE- cromatografia líquida de alta eficiência; W2- clone resistente a cloroquina e sensível a mefloquina; 3d7- clone sensível a cloroquina; + positivo; DCL-S (Fo)- extrato

diclorometano de folhas obtido em aparelho de Soxhlet; ETOH-S (Fo)- extrato etanólico de folhas obtido em aparelho de Soxhlet; DCL-S (Ca)- extrato diclorometano de caules obtido em aparelho de Soxhlet; DCL-S (Cs)- extrato diclorometano de cascas obtido em aparelho de Soxhlet; ETOH-P (Cs)- extrato etanólico de cascas obtido em aparelho de Soxhlet.

*- Tabela 8 (pg. 98) e Anexo 1 (pg. 154)

7.2.3- *Aspidosperma ramiflorum*

Todos os extratos de *A. ramiflorum* revelaram positivamente para alcalóides em CCDS, porém apenas os extratos ETOH-P (Ca) e DCL-S (Cs) apresentaram picos intensos, provavelmente relacionados a alcalóides, em CLAE (Anexo 1, pg. 156). As condições cromatográficas utilizadas em CLAE foram padronizadas utilizando-se o extrato etanólico de cascas de *A. pavifolium*, que contém uleína (18), epiuleína (19), aparicina (39) e desmetiluleína (40) (JÁCOME, 1998), e estes alcalóides são estruturalmente diferentes dos alcalóides presentes em *A. ramiflorum* [ramiflorina A e B (61 e 62), 10-metoxigeissoschizol (60) e β-yoimbina (31)] (MARQUES *et al.*, 1996 e JÁCOME, 1998). Estas diferenças estruturais dos alcalóides, e as condições adotadas no CLAE podem não ser adequadas para determinar o perfil dos extratos de *A. ramiflorum*.

Em relação à atividade antiplasmódica, os extratos DCL-S (Fo), DCL-S (Ca), ETOH-S (Ca) e DCL- S (Cs) foram muito ativos em 3d7, enquanto que apenas os extratos DCL-S (Fo) e DCL (Cs) mostraram-se ativos em W2 (Tabela 9, pg.96 e Tabela 26, pg. 121). A atividade antiplasmódica de extratos de *A. ramiflorum* deve estar também, relacionada às ramiflorinas A e B.

A atividade anti-protozoário de *A. ramiflorum* foi descrita por Ferreira e cols. (2004). O extrato alcaloídico mostrou-se ativo contra *Leishmania (L.) amazonensis* ($DL_{50} < 47 \mu\text{g/mL}$) e esta deve estar relacionada à ramiflorina A (61) e B (62) (FERREIRA *et al.*, 2004). Também, o extrato metanólico, frações obtidas por extração ácido-base, ramiflorina A (61) e ramiflorina B (62) mostraram-se ativos em bactérias Gram positivas (TANAKA *et al.*, 2006).

Tabela 26: Correlação entre os resultados obtidos em CCDS, CLAE e atividade antiplasmódica de *A. ramiflorum*.

Extratos	Alcalóides		Atividade antiplasmódica**	
	CCDS	CLAE*	W2	3d7
ETOH-P (Fo)	+	TR1,40 e 2,10 min	moderada	Moderada
DCL-S (Fo)	+	2 pouco intensos, TR=1,44 e 2,30 min	ativo	Ativo
ETOH-P (Ca)	+	4 intensos, TR=1,24; 1,56; 1,88 e 2,92 min	moderada	Moderada
DCL-S(Ca)	+	2 pouco intensos, TR= 1,42 e 2,12 min	NT	Ativo
ETOH-S (Ca)	+	1 pouco intenso, TR= 1,38 min	Moderada	Ativo
DCL- S(Cs)	+	2 intenso, TR= 1,37 e 8,48min	ativo	Ativo

Legenda: CCDS- cromatografia em camada delgada de sílica gel; CLAE- cromatografia de alta eficiência; W2- clone resistente a cloroquina e sensível a mefloquina; 3d7- clone sensível a cloroquina; ETOH-P (Fo)- extrato etanólico de folhas obtido por percolação; DCL-S (Fo)- extrato diclorometano de folhas obtido em aparelho de Soxhlet; ETOH-P (Ca)- extrato etanólico de caules obtido por percolação; DCL-S (Ca)- extrato diclorometano de caules obtido em aparelho de Soxhlet; ETOH-S (Ca)- extrato etanólico de caules obtido em aparelho de Soxhlet e DCL-S (Cs)- extrato diclorometano de cascas obtido em aparelho de Soxhlet; NT- não testado.

*- Tabela 8 (pg. 94) e Anexo 1 (pg. 156)

** Tabela 9 (pg. 96)

7.2.4- *Aspidosperma spruceanum*

De *A. spruceanum* já foram isolados aspidoalbina (62), acetilaspidoalbina (63) e desmetilaspidolimidina (64) (GILBERT *et al.*, 1965), logo se esperava a presença alcalóides em CCDS (Anexo 1, pg. 158; Tabela 8, pg. 95 e Tabela 27, pg. 122). Apenas os extratos obtidos das cascas revelaram positivamente, o que pode estar relacionado ao fato de as cascas, em geral apresentarem maior teor de alcalóides. Em CLAE, foram observados picos intensos, com baixos TRs, possivelmente devidos a alcalóides, em todos os extratos, exceto em ETOH (Fo) e ETOH-S (Ca). No cromatograma (CLAE) de DCL-S (Fo) observam-se 3 picos de intensidades semelhantes enquanto que, nos outros tem-se 1 pico intenso, com $TR < 5$ min. Neste caso, poderia estar ocorrendo superposição de picos o que se justificaria por uma possível semelhança estrutural de alcalóides presentes (Tabelas 8, pg. 95; Tabela 27, pg. 122 e Anexo 1, pg. 158).

Os extratos com maior atividade antiplasmódica foram aqueles obtidos com diclorometano em aparelho de Soxhlet (Tabela 9, pg. 97 e Tabela 27, pg. 122). Este método favorece a extração de alcalóide presentes nas cascas de caules, e estes, são provavelmente os responsáveis pela atividade antiplasmódica (Tabela 9, pg. 97 e Tabela 27, pg. 122).

Tabela 27: Correlação entre os resultados obtidos em CCDS, CLAE e atividade antiplasmódica de *A. spruceanum*.

Extratos	Alcalóide		Atividade antiplasmódica**	
	CCDS	CLAE*	W2	3d7
ETOH-P (Fo)	-	3 intensos, TR=1,14 e 1,50	moderada	inativo
DCL- S (Fo)	-	1 intenso, TR=1,17; 1,51 e 1,92	moderada	moderada
DCL- S (Ca)	-	1 intenso, TR=1,17	ativo	ativo
CLOR-P (Ca)	-	ND	moderada	inativo
ETOH-P (Cs)	+	1 intenso, TR=1,13	moderada	moderada
DCL- S(Cs)	+	1 intenso, TR=1,11	ativo	moderada
ETOH-S (Cs)	+	1 intenso, TR=1,1	moderada	moderada

Legenda: CCDS- cromatografia em camada delgada em sílica gel; CLAE- cromatografia líquida de alta eficiência; W2- clone resistente a cloroquina e sensível a mefloquina; 3d7- clone sensível a cloroquina; ETOH-P (Fo)- extrato etanólico de folhas obtido por percolação; DCL-S (Fo)- extrato diclorometano de folhas obtido em aparelho de Soxhlet; ETOH-S Fo)- extrato etanólico de folhas obtido em aparelho de Soxhlet; DCL-S (Ca)- extrato diclorometano de caules obtido em aparelho de Soxhlet; CLOR-P (Ca)- extrato clorofórmico de galhos obtido por percolação; g- ETOH-P (Cs)- extrato etanólico de cascas obtido por percolação; h- DCL-S (Cs)- extrato diclorometano de cascas obtido em aparelho de Soxhlet e i- ETOH-P (Cs)- extrato etanólico de cascas obtido em aparelho de Soxhlet.

*- Tabela 8 (pg. 95) e Anexo 1 (pg. 158)

**- Tabela 9 (pg. 97)

7.2.5- *Aspidosperma tomentosum*

Uleína (18), epiuleína (19) e limatinina (66) já foram isolados de *A. tomentosum* (ARNDT *et al.*, 1967). De fato, em CCDS, foram observadas as manchas provavelmente relacionadas aos alcalóides (reagente Dragendorff). Em CLAE, nos cromatogramas dos extratos obtidos de *A. tomentosum* observam-se que os picos, possivelmente relacionados aos alcalóides, estão superpostos. Esta superposição dos picos deve estar relacionada ao fato das semelhanças estruturas dos alcalóides presentes nesta planta (Tabela 8, pg. 95 e Tabela 28, pg. 123).

A atividade antiplasmódica de extratos de *A. tomentosum*, em geral, foi moderada (Tabela 9, pg. 97 e Tabela 28, pg. 123). No presente estudo, a atividade antiplasmódica da uleína foi demonstrada, e esta substância pode ser a principal responsável pela atividade antiplasmódica do extrato etanólico obtido das sementes de *A. tomentosum* no clone 3d7 (Tabela 9, pg. 97; Tabela 28, pg. 123 e Anexo 1, pg.160).

O extrato etanólico das sementes de *A. tomentosum* mostrou-se ativo no clone 3d7 e, por isso sua citotoxicidade foi avaliada, sendo observada uma baixa citotoxicidade ($CC_{50} > 500 \mu\text{g/mL}$). O IS para 3d7 foi moderado e para W2 foi baixo (Tabela 10, pg. 98).

Tabela 28: Correlação entre os resultados obtidos em CCDS, CLAE e atividade antiplasmódica de extratos etanólicos *A. tomentosum*.

	Alcalóides		Atividade antiplasmódica**	
	CCDS	CLAE*	W2	3d7
ETOH-P (Ca)	+	Intenso, TR=1,14; 1,32; 9,3 e 19,18	moderada	moderada
ETOH-P (Fo)	-	Intenso, TR=1,18	moderada	moderada
ETOH-P (Fr)	+	Intenso, TR=1,13 e 1,39	moderada	moderada
ETOH-P (Se)	+	Intenso, TR=1,18 e 1,79	moderada	Ativo

Legenda: CCDS- cromatografia em camada delgada em silíca gel; CLAE- cromatografia líquida de alta eficiência; W2- clone resistente a cloroquina e sensível a mefloquina; 3d7- clone sensível a cloroquina; ETOH-P (Ca): extrato etanólico de caules obtidos por percolação; ETOH-P (Fo): extrato etanólico de folhas obtidos por percolação; ETOH-P (Fr): extrato etanólico de frutos obtidos por percolação e ETOH-P (Se): extrato etanólico de sementes obtidos por percolação.

*- Tabela 8 (pg. 95) e Anexo 1 (pg. 160)

**- Tabela 9 (pg. 97)

7.3- *A. parvifolium*: análises fitoquímicas, atividades antiplasmódica, citotoxicidade e índice de seletividade

7.3.1- Estudos fitoquímicos

Em todas as amostras analisadas em CCDS foram detectados alcalóides, triterpenos e esteróides, e as análises foram negativas para cumarinas. No ETOH-P (Cs), APN-1 e APN-2 revelaram positivamente para saponinas. Já, no ETOH-P (Cs), APT-1 e APT-2 foi observada a presença de flavonóides (Tabela 12, pg. 100), sendo que estes resultados estão de acordo com Jácome e cols. (2004).

O ETOH-P (Cs) de *A. parvifolium* e as frações foram submetidos a análises cromatográficas em CCDS, utilizando-se a uleína-se como referência para alcalóides. Na prospecção fitoquímica do ETOH-P (Cs) de *A. parvifolium*, por CCDS, foi detectada a presença de alcalóides e flavonóides (JÁCOME *et al.*, 2004). O fracionamento anterior de APN levou ao isolamento do lupeol, estigmasterol e aparicina e do fracionamento de APT foram isolados uleína e epiuleína (JÁCOME, 1998 e JÁCOME *et al.*, 2004).

A Figura 15 (pg. 100) mostra uma placa cromatográfica (CCDS) revelada com anilsaldeído- ácido sulfúrico, onde a coloração azul aparece em todas as amostras e está relacionada à presença dos alcalóides, como se pode deduzir a partir da mancha de uleína.

Para a análise por CLAE, foi realizada previamente uma padronização (resultados não mostrados no presente trabalho), e selecionada a melhor condição analítica:

- Coluna RP-18;
- Temperatura de eluição=30º C;
- Fluxo=1 mL/min.;
- Detecção= UV 300 nm;
- Fase móvel: Tampão fosfato pH 2,6 (A) e Acetonitrila (B); T= 0 min: 85% A: 15% B; T= 5 min: 80% A: 20% B; T= 30 min: 60% A: 40% B; T= 40 min: 20% A: 80% B; T= 50 min: 85% A: 15% B.

A coluna de fase reversa (RP- 18) é muito eficaz na análise qualitativa e quantitativa de alcalóides (FALKENHAGEN *et al.*, 1993). Porém, substâncias básicas podem interagir com os grupos silanóis (Si-O-H) da fase estacionária, aumentando seu tempo de retenção e interferindo, também, na intensidade dos picos. A fim de reduzir o tempo de retenção dos alcalóides pode-se usar uma fase móvel contendo tampão fosfato em pH 2,5 (GERASIMENKO *et al.*, 2001). Nestas condições, os alcalóides estarão na forma de sais ($R_3N^+ \cdot H$) que, sendo muito polares, serão eluídos rapidamente da coluna e apresentarão valores baixos para os tempos de retenção (TR).

O maior problema da utilização de fase móvel com pH 2,5 está relacionado à coluna, uma vez que pH muito ácido pode danificar a fase reversa, podendo ocorrer à quebra da ligação éter do grupo C18 ao silanol, reduzindo sua vida útil. Visando minimizar este efeito do pH ácido sobre a coluna, a temperatura foi reduzida de 40º C para 30º C.

Os alcalóides indólicos de *A. parvifolium* apresentam máximos de absorção no UV em torno de 210 e 300 nm (JÁCOME, 1998). Após alguns experimentos utilizando-se os comprimentos de onda de 210 nm e 300 nm, observou-se que, em 210 nm, vários picos apareciam no cromatograma e estes, em sua maioria, não estavam relacionados aos alcalóides. Já quando se utilizou 300 nm os picos relacionados aos alcalóides estavam presentes, mas os picos relacionados às outras substâncias não eram observados. Então, conclui-se que o mais adequado seria trabalhar a 300 nm, visto que se queria traçar o perfil cromatográfico preferencialmente dos alcalóides indólicos.

As vantagens das condições adotadas foram: 1- boa repetividade nos tempos de retenção, isto é, os extratos/frações/substâncias foram submetidos a várias análises (no mínimo três), em dias diferentes, sendo observados praticamente, os mesmos tempos de retenção; 2- nas condições adotadas, os alcalóides estão protonados e por isso possuem tempos de retenção (TR) baixos, sendo observados seus picos no início dos cromatogramas (Figura 16, pg. 101-102 e Tabela 13, pg. 104).

7.3.2- Atividade antiplasmódica, citotoxicidade e índice de seletividade do ETOH-P (Cs) de *A. parvifolium*, frações e uleína

7.3.2.1- Correlação dos resultados obtidos nos estudos fitoquímicos e a atividade antiplasmódica *in vitro*

O fracionamento do extrato etanólico de cascas de *A. parvifolium* levou ao aumento da atividade antiplasmódica (Tabela 15, pg. 109 e Tabela 29, pg. 126), o que, provavelmente, está relacionado ao fato de as frações APT-1 e 2 conterem maiores teores de uleína que o extrato etanólico. Porém, as análises em CCDS e CLAE demonstraram que tanto o extrato como as frações contêm alcalóides (Tabela 12, pg. 100; Figura 15, pg. 100; Figura 16, pg. 101-102 e Tabela 29, pg. 125).

Tabela 29: Correlação entre os resultados obtidos em CCDS, CLAE e atividade antiplasmódica para o extrato etanólico de cascas de *A.parvifolium*, frações e APT 13-16 (8)/ uleína.

	Alcalóides		Atividade antiplasmódica**	
	CCDS	CLAE*	W2	3d7
ETOH-P (Cs)	+	intenso	Moderada	Moderada
APN-1	+	Intenso	Moderada	Moderada
APN-2	+	Intenso	Ativa	Moderada
APT-1	+	intenso	Ativa	Ativa
APT-2	+	Intenso	Ativa	Ativa
APT 13-16 (8)/uleína	+	intenso	Ativa	Ativa

Legenda: CCDS- cromatografia em camada delgada; CLAE- cromatografia líquida de alta eficiência; clone W2- resistente a cloroquina e sensível a mefloquina; clone 3d7- sensível a cloroquina; APN-1- fração de neutros 1 (Figura 11, pg. 73); APN-2- fração de neutros 2 (Figura 12, pg. 74); APT-1- fração de alcalóides totais 1 (Figura 11, pg. 73); APT-2- fração de alcalóides totais 2 (Figura 12, pg. 74).

*- Tabela 12, pg. 100; Figura 16, pg. 101-102.

**-Tabela 15, pg. 109.

Vale ressaltar que, quando se compara a CI_{50} ($32,75 \pm 1,06 \mu\text{g/mL}$) do ETOH-P (Cs) de *A. parvifolium* à CI_{50} do extrato metanólico da *Artemisia annua* ($CI_{50} = 3,9 \mu\text{g/mL}$), de onde foi isolada a artemisinina (5), ou ao extrato metanólico de *Cinchona calisaya* ($CI_{50} =$

0,5 µg/mL), sendo que deste gênero foi isolada a quinina (1), fica ainda mais claro que o ETOH-P (Cs) de *A. parvifolium* apresenta uma atividade antiplasmódica moderada. No entanto, APT-1, APT-2 e APT 13-16(8)/ uleína (18)são mais ativas no clone de *P. falciparum* W2 que o extrato metanólico de *A. annua* (Tabela 15, pg. 108).

7.3.2.2- Ensaio radioisotópico de extrato etanólico de cascas de *A. parvifolium* e frações

Este ensaio fundamenta-se no seguinte princípio: os parasitos para amadurecerem, nas hemárias, necessitam de hipoxantina que está contida no meio. No presente ensaio, a hipoxantina incorporada pelo parasito é radioativa, [8³H]- hipoxantina, que emite radiação beta, sendo a emissão proporcional à incorporação da hipoxantina e, portanto, indicativa da concentração de parasitas viáveis.

Quando se compararam as CI₅₀ obtidas no microteste tradicional (Tabela 15, pg. 108) com as CI₅₀ obtidas no microteste com hipoxantina (Tabela 16, pg. 109), observa-se que as últimas, em geral, são mais elevadas, o que é explicado pelo fato de que, quando se utiliza a hipoxantina, o tempo de exposição à amostra é menor (42h em estufa seguida de armazenamento a -20º C) do que aquele no ensaio tradicional (72h). Outro fator que pode estar favorecendo a menor CI₅₀ no ensaio tradicional é a exposição a mais de 1 dose, isto é, no tempo zero os parasitos entram em contato com a 1^a dose; após 24 e 48h o meio é removido e adicionadas novas doses, 2^a e 3^a doses respectivamente, sendo o efeito final a somatória das 3 doses (CARVALHO, 1990). Já, quando se utiliza a hipoxantina radioativa, no tempo zero, o parasito entra em contato com a dose da amostra (extrato/frações/substâncias), 24h após adiciona-se a [8³H]-hipoxantina e após a18h o cultivo é armazenado a -20º C para que ocorra a hemólise e possa ser realizada a medida da radiação β (DESJARDINS *et al.* 1979).

Quando se consideram os parâmetros descritos por Basco e cols. (1994), em que, de acordo com as CI₅₀ as substâncias são classificadas como ativas (CI₅₀ < 10 µg/mL); moderadamente ativas (CI₅₀ entre 10 a 100 µg/mL) e inativas (CI₅₀> 100 µg/mL), observa-se uma boa correlação entre os resultados obtidos nos dois ensaios, isto é a maioria das

amostras moderadamente ativas pelo método tradicional foram moderadamente ativas no ensaio com [8^3H] hipoxantina. As amostras foram ativas em ambos os métodos (Tabela 30, pg. 127).

Quando se emprega o método tradicional para avaliar a atividade antiplasmódica das amostras tem-se como desvantagem a necessidade de pessoa treinada para realizar a leitura das lâminas e, em geral esta leitura é muito demorada devido ao elevado número de lâminas a serem examinadas ao microscópio. As vantagens deste método são: a boa repetitividade dos resultados percentuais e a observação da morfologia dos parasitos.

No caso da hipoxantina marcada, as vantagens são a facilidade e a rapidez das leituras, que são realizadas em um β -cintilador. As desvantagens desta técnica são: o custo mais elevado, uma vez que é necessário um equipamento de custo razoável (U\$ 40,000); a utilização de produto radioativo; a menor repetitividade dos resultados, além de não ser possível observar a morfologia do parasito.

O ensaio utilizando a hipoxantina marcada é uma ferramenta muito útil quando se tem um número elevado de amostras a avaliar. Uma vez realizada a triagem e identificadas às amostras ativas, o ideal é realizar o microteste tradicional com estas amostras para confirmar a atividade e avaliar os aspectos morfológicos dos parasitos.

Tabela 30: Correlação entre os resultados obtidos no microteste tradicional e o método isotópico.

	Microteste tradicional*		Microteste radioisotópico**	
	W2	3d7	W2	3d7
ETOH-P (Cs)	moderada	moderada	moderada	moderada
APN-1	moderada	moderada	moderada	moderada
APN-2	Ativa	moderada	ativa	moderada
APT-1	Ativa	Ativa	ativa	moderada
APT-2	Ativa	Ativa	ativa	ND

Legenda: clone W2- resistente a cloroquina e sensível a mefloquina; clone 3d7- sensível a cloroquina; APN- 1- fração de neutrinos (Figura 11, pg. 73); APN- 2- fração de neutrinos (Figura 12, pg. 74); APT-1- fração de alcalóides totais (Figura 11, pg. 73); APT-2- fração de alcalóides totais (Figura 12, pg. 74); ND- não determinado.

*- Tabela 15, pg. 109.

**- Tabela 16, pg. 110.

7.3.2.3- Citotoxicidade de extrato etanólico de cascas de *A. parvifolium*, frações e APT 13-16 (8)/ uleína (18)

O ETOH-P (Cs) *A. parvifolium* mostrou-se pouco tóxico para células VERO (CC₅₀ > 500 $\mu\text{g/mL}$) enquanto que as frações APN-1 e APT-1 e a APT-13- 16 (8) /uleína (18)

mostraram uma toxicidade moderada ($100 < \text{CC}_{50} < 500 \mu\text{g/mL}$). Quando se determinou o índice de seletividade utilizando-se os resultados obtidos para o clone W2 (Tabela 15, pg. 108) observou-se que quanto mais pura a amostra, maior seu índice de seletividade. Porém quando se utilizam os resultados obtidos para o clone 3d7 (Tabela 15, pg. 108), as alterações nos índices de seletividade são discretas e menos favoráveis (Tabela 17, pg. 110).

Alcalóides isolados de outras espécies pertencentes ao gênero *Aspidosperma* já foram submetidos a ensaios para avaliar a atividade antiplasmódica e a citotoxicidade. De *A. pyrifolium* e *A. megaloncarpon* foram isolados 12 alcalóides indólicos com esqueleto aspidospermano. Todos os alcalóides foram submetidos ao ensaio, *in vitro* em *P. falciparum* (FcM29 clone resistente a cloroquina), pelo método da hipoxantina marcada (DESJARDINS *et al.*, 1979 e VALENTIN *et al.*, 1997). Destes alcalóides, apenas 6 foram submetidos a avaliação de citotoxicidade em cultura de células de linhagem de fibroblastos humanos (NIH2T3), o que permitiu a determinação do índice de seletividade (IS). Estes resultados encontram-se na Tabela 31 (pg. 131) (MITAINE-OFFER *et al.*, 2002).

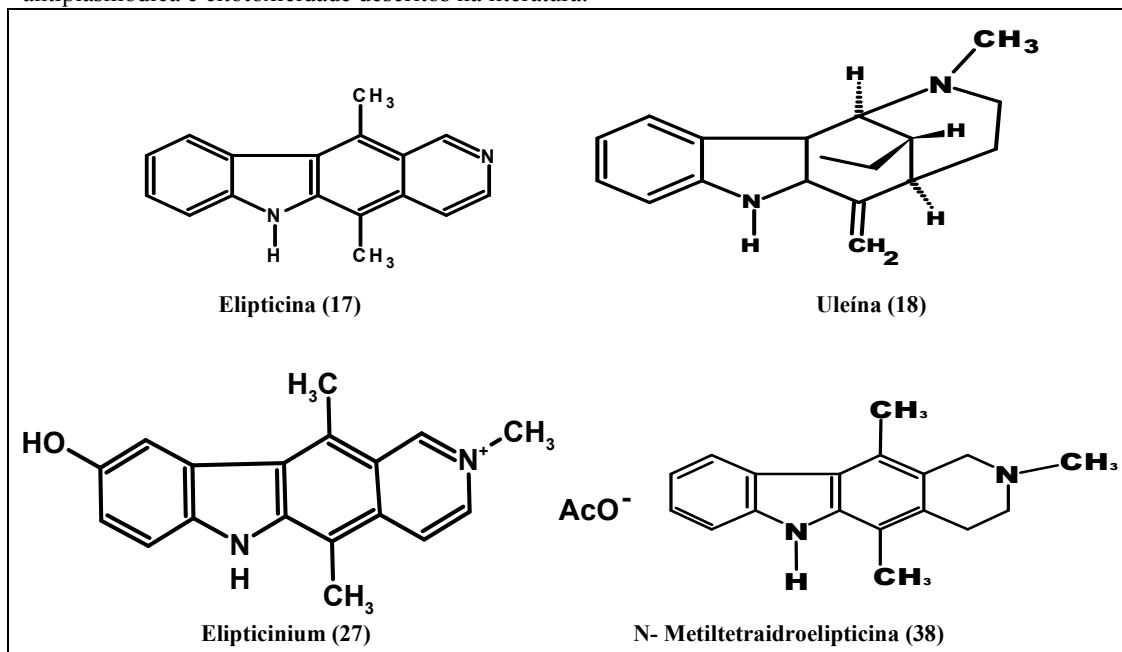
Henrique (2007) isolou de *A. vargasii* a elipticina (17) e a N-metiltetradiroelipticina (38). Estes alcalóides foram submetidos ao ensaio *in vitro* em *P. falciparum* (K1 clone multiresistente) pelo método tradicional. Utilizando diferentes linhagens celulares tumorais (HL-60, MDA-MB, HCT e SF295) determinou-se a citotoxicidade pelo método colorimétrico do MTT. Os resultados estão na Tabela 31 (pg. 130) (ANDRADE-NETO *et al.*, 2007 e HENRIQUE, 2007).

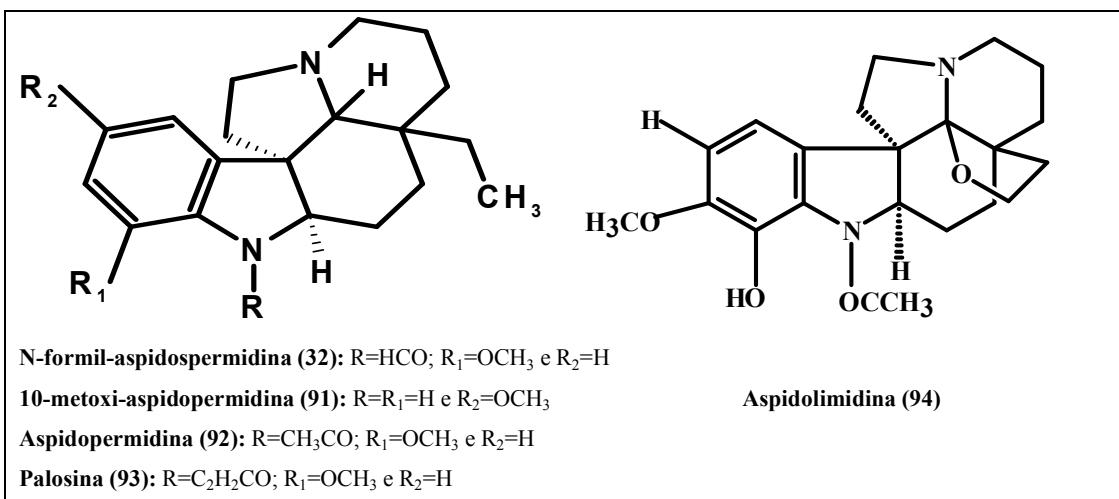
A elipticina (17) e a N-metiltetraidroelipticina (38) foram os alcalóides com maior atividade antiplasmódica, porém mostraram-se muito citotóxicas, sendo seus índices de seletividade muito baixos (Tabela 31, pg. 131). Dos alcalóides testados por Mitaine-Offer e cols (2002), 10-metoxi-aspidospermidina (91), N-formil-aspidospermidina (32) e aspidospermidina (92) foram os mais ativos, porém mostraram-se muito citotóxicos e seus índices de seletividade também foram baixos (Tabela 31, pg. 130 e Quadro 16, pg. 129).

A APT 13-16 (8)/ uleína (18) mostrou atividade antiplasmódica menor que a elipticina (17) e N-metiltetraidroelipticina (38), porém foi menos citotóxica e seu índice de seletividade foi mais elevado. Avaliando o binômio risco: benefício, pode-se concluir que a APT 13-16 (8)/ uleína (18) apresenta um maior potencial a candidato a fármaco antimalárico do que a elipticina (17) e a N-metiltetraidroelipticina (38).

Comparando os índices de seletividade (IS) relatados para uleína (18) e cloroquina observam-se valores bastante diversos (Tabela 32, pg. 131). Wright e cols (1993) relataram que o IS da cloroquina é 376, isto é, menor que aquele encontrado para uleína (IS= 500). Já em outros trabalhos, a cloroquina apresentou maior IS que a uleína (WRIGHT *et al.*, 1994; LIKHITWITAYAWUID *et al.*, 1993). Em relação à mefloquina (2), o IS da uleína (18) foi próximo desta droga (LIKHITWITAYAWUID *et al.*, 1993) (Tabela 32, pg. 131). Esta diversidade de valores está relacionada a diferentes cepas de *P. falciparum* e linhagens celulares empregadas na determinação da CI_{50} e CC_{50} , respectivamente.

Quadro 16: Estruturas químicas de alcalóides de *Aspidosperma* submetidos a ensaios *in vitro* para atividade antiplasmódica e citotoxicidade descritos na literatura.





Fonte: JÁCOME, 1998.

Tabela 31: Comparação do efeito antiplasmódico, citotoxicidade e índice de seletividade da APT 13-16 (8)/ uleína (18) a outros alcalóides indólicos de *Aspidosperma* spp descritos na literatura.

Alcalóide	Cl ₅₀ (μM)	CC ₅₀ (μM)	IS	Referência
APT 13-16 (8)/ uleína (18)	2,8 (W2)	1408,3	500,0	Nesta tese
10-metoxi-aspidospermidina (91)	3,2 (FcM29)	72,1 (NIH2T3)	22,7	MITAINE-OFFER <i>et al.</i> , 2002
N-formil-aspidospermidina (32)	5,6 (FcM29)	87,1 (NIH2T3)	15,6	MITAINE-OFFER <i>et al.</i> , 2002
Aspidopermidina (92)	5,6 (FcM29)	46,2 (NIH2T3)	8,3	MITAINE-OFFER <i>et al.</i> , 2002
Palosina (93)	12,7 (FcM29)	40,8 (NIH2T3)	3,2	MITAINE-OFFER <i>et al.</i> , 2002
Aspidolimidina (94)	49,5 (FcM29)	13,0 (NIH2T3)	0,3	MITAINE-OFFER <i>et al.</i> , 2002
Elipticina (17)	0,073 (K1)	0,44-6,18 *	6,03-84,64	ANDRADE-NETTO <i>et al.</i> , 2007; HENRIQUE, 2007
N-metiltetra-diroelipticina (38)	0,69 (K1)	13,7-26,67*	19,8-38,6	HENRIQUE, 2007

Legenda: Cl₅₀- concentração inibitória 50%; CC₅₀- concentração citotóxica 50%; IS- índice de seletividade; μM- micromolar. Clones W2 e FcM29 clone resistente a cloroquina; clone K1- multi-resistente; NIH2T3- células de linhagem de fibroblastos humano e * outras linhagens celulares.

Tabela 32: Comparação do IS da APT 13-16 (8)/ uleína (18) com os IS da cloroquina e mefloquina descritos na literatura.

Substância	IS	Referências
APT 13-16 (8)/ uleína (18)	500	Nesta tese
Cloroquina (3)	376	WRIGHT <i>et al.</i> , 1993
Cloroquina (3)	981	WRIGHT <i>et al.</i> , 1994
Cloroquina (3)	8000	LIKHITWITAYAWUID <i>et al.</i> , 1993
Mefloquina (2)	588	LIKHITWITAYAWUID <i>et al.</i> , 1993

7.4- Relação entre dados da literatura e os resultados obtidos para *Esenbeckia febrifuga*

E. febrifuga, conhecida popularmente como quina-do-mato, é utilizada na medicina tradicional brasileira para o tratamento de febre e malária. Estudos em camundongos infectados com *P. berghei*, demonstraram redução de 18% da parasitemia sanguínea na dose de 1,0 g/Kg/dia (CARVALHO, 1990). Baseado nestas informações selecionou-se esta planta para estudos fitoquímicos, avaliação da atividade antiplasmódica e citotoxicidade.

7.4.1- Estudos fitoquímicos e cromatográficos em CCDS e CLAE, atividade antiplasmódica e citotoxicidade

Inicialmente, o extrato etanólico de caules de *E. febrifuga* foi submetido à extração ácido-base (Figura 12, pg. 74). Em seguida, extrato e frações foram submetidos a análises cromatográficas (Tabela 19, pg. 114).

Placas cromatográficas (CCDS) contendo o extrato de *E. febrifuga*, frações e os alcalóides isolados deste extrato pelo grupo do Prof. Dr. H. Wagner (Universidade de Munique, Alemanha), apresentaram fluorescência azul, porém não revelaram pelo reagente de Dragendorff (Tabela 19, pg. 113 e Tabela 33, pg. 132). Resultados negativos para alcalóides, obtidos em CCDS quando reveladas com reagente de Dragendorff, não significam ausência destes metabólitos. Quinolonas e acridonas são lactamas e, como amidas, são bases muito fracas o que pode justificar a não reação com o reagente de Dragendorff. Outro revelador utilizado foi anisaldeído-ácido sulfúrico, porém os alcalóides desta planta também não revelaram, com este reagente.

Extratos obtidos de espécies pertencentes ao gênero *Esenbeckia* podem conter diferentes metabólitos secundários, como alcalóides quinolínicos, furanoquinolínicos, quinolonas e acridonas (DREYER *et al.*, 1980; GUILHON *et al.*, 1994; OLIVEIRA *et al.*, 1996 e SIMPSOM & JACOBS, 2005); cumarinas e furanocumarinas (DREYER *et al.*, 1980; GUILHON *et al.*, 1994; OLIVEIRA *et al.*, 1996; TRANI *et al.*, 1997; RIOS & DELGADO, 2002 e SIMPSOM & JACOBS, 2005); flavonóides (KUBO, 1991); liminóides (OLIVEIRA *et al.*, 1996); derivados do ácido cinâmico (GUILHON *et al.*, 1994) e triterpenos (RIOS & DELGADO, 1992).

Em CLAE, as condições empregadas permitiram identificar os picos relacionados aos alcalóides isolados em todas as amostras [ETOH-P (Ca), EFN e EFT], sendo que todas as amostras também apresentaram atividade antiplasmódica moderada (Tabela 19, pg. 114 e Tabela 33, pg.133). Analisados os resultados obtidos em CCDS e CLAE das frações obtidas a partir de ETOH-P (Ca) *E. febrifuga*, pode-se concluir que a extração ácido-base não foi eficaz para separar os alcalóides desta planta (Tabela 33, pg. 132).

Tabela 33: Correlação entre os resultados obtidos em CCDS, CLAE e atividade antiplasmódica de *E. febrifuga* e frações.

	Alcalóides*		Atividade antiplasmódica**	
	CCDS	CLAE	W2	3d7
ETOH-P (Ca)	-	+	moderada	Moderada
EFN	-	+	moderada	ND
EFT	-	+	moderada	Moderada

Legenda: W2- resistente a cloroquina e sensível a mefloquina; 3d7- sensível a cloroquina; CCDS- cromatografia em camada delgada em sílica gel; CLAE- cromatografia líquida de alta eficiência; + positivo; - negativo; ETOH- P (Ca)- extrato etanólico de caules de *E. febrifuga* obtido por percolação; EFN- *E. febrifuga* neutros e EFT- *E. febrifuga* alcalóides totais; ND- não determinado.

*- Tabela 19, pg. 113, Figura 18, pg. 113-114.

**- Tabela 20, pg. 115.

Quando se comparam os valores de CI_{50} obtidos pelos métodos tradicional e radioisotópico observam-se variações numéricas, porém estas se mantêm na mesma faixa de atividade moderada (Tabela 34, pg. 133).

De acordo com Carvalho (1990), o extrato de caules de *E. febrifuga* apresentou atividade parcial em ensaios *in vivo* contra as formas sanguíneas do *Plasmodium berghei*, na dose de 1000 mg/kg de camundongo. A atividade antiplasmódica moderada *in vitro* (*P. falciparum*) aqui descrita vem confirmar estes resultados.

O processo extrativo ao qual foi submetido este extrato não contribuiu para a melhoria na atividade antiplasmódica, visto que, as frações obtidas apresentaram valores de CI_{50} um pouco mais elevados que aquele do extrato (Tabela 20, pg. 115). Além disso, as frações EFN e EFT mostraram-se mais tóxicas e com menor IS (Tabela 22, pg. 116).

As substâncias puras avaliadas foram moderamente ativas (γ -fagarina e skimmiamina) e inativas (rutaevina e HMMA). A flindersiamina foi inativa para 3d7 e sua CI_{50} para W2 foi próxima à faixa considerada inativa. Todas as amostras apresentaram atividade antiplasmódica inferior a cloroquina e mefloquina (Tabela 20, pg. 115 e Tabela 34, pg. 133), confirmando, mais uma vez, que o potencial antimarialárico desta espécie, de suas frações e substâncias é baixo.

Tabela 34: Correlação entre os resultados obtidos no microteste tradicional e o método radioisotópico.

Amostra	Microteste tradicional*		Método radioisotópico**	
	W2	3d7	W2	3d7
Cloroquina	Ativo	ativo	ativo	Ativo
Mefloquina	Ativo	ativo	ativo	Ativo
ETOH-P (Ca)	Moderada	moderada	moderada	Moderada
EFN	Moderada	ND	moderada	Moderada
EFT	Moderada	moderada	moderada	Moderada
Flindersiamina	Moderada	inativo	ND	Moderada
Skimmiamina	Moderada	moderada	ND	Moderada

Legenda: W2- resistente a cloroquina e sensível a mefloquina; 3d7- sensível a cloroquina; ETOH-P (Ca)- extrato etanólico de caules de *E. febrifuga* obtido por percolação; EFN- *E. febrifuga* neutros e EFT- *E. febrifuga* alcalóides totais; ND- não determinado.

* Tabela 20, pg. 115.

** Tabela 21, pg. 115.

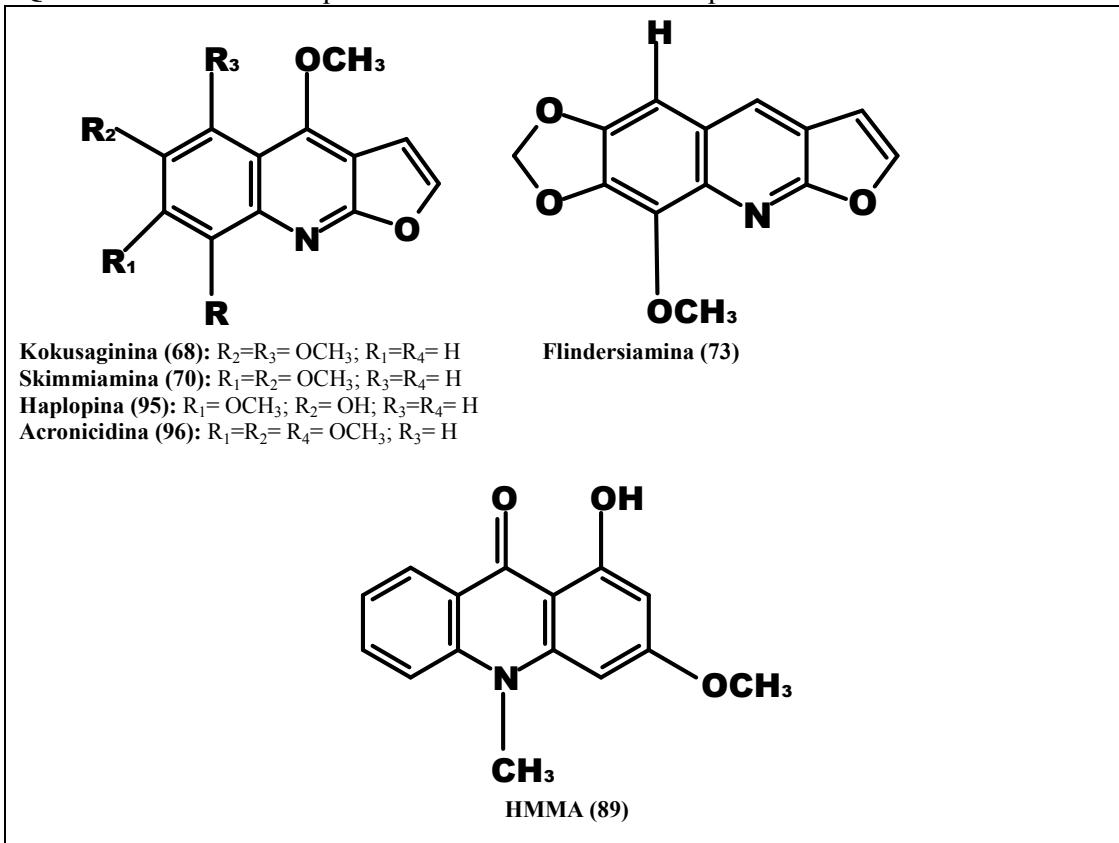
Quando e compararam os resultados obtidos (CI_{50}) para as substâncias isoladas de *E. febrifuga*, observa-se que a skimmiamina (70) apresentou atividade antiplasmódica moderada neste trabalho e quando avaliada por BASCO e cols.(1994), outros alcalóides quinolínicos, como por exemplos haploidina (95), kokusaginina (68), e outras acridonas como, por exemplo acronicidina (96) (Tabela 35, pg. 134), mostraram-se ativas em W2. A CI_{50} da γ -fagarina (71) obtida neste trabalho foi próxima à descrita na literatura (RANDRIANARIVELOJOSIA *et al.*, 2003), as diferenças observadas devem estar relacionadas aos clones usados para determinação da atividade antiplasmódica (Tabela 35, pg. 134).

Tabela 35: Comparação da atividade antiplasmódica dos alcalóides de *E. febrifuga* com os dados da literatura.

Substâncias	Presente trabalho	Dados da literatura	Referencia
	CI ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	CI ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	
Skimmiamina (70)	19,5	14,1	BASCO <i>et al.</i> , 1994
Flindersiamina (73)	95,0		Nesta tese
HMMA (89)	>100		Nesta tese
γ -Fagarina (71)	36,0	22,6*	RANDRIANARIVELOJOSIA <i>et al.</i> 2003
Haplopidina (95)	ND	8,34	BASCO <i>et al.</i> , 1994
Kokusaginina (68)	ND	7,7	BASCO <i>et al.</i> , 1994
Acronicidina (96)	ND	5,72	BASCO <i>et al.</i> , 1994

*clone FcM29.

Quadro 17: Estruturas químicas dos alcalóides furanoquinolinicos da Tabela 35.



7.5- Análise da atividade antiplasmódica dos extratos, frações e substâncias.

Das 7 espécies estudadas, aquela com maior número de extratos com atividade antiplasmódica foi *A. olivaceum*, seguida de *A. ramiflorum* e *A. spruceanum*. Das demais espécies, todos os extratos testados foram moderadamente ativos nos clones W2 e 3d7 de *P. falciparum* (Tabela 36, pg. 135).

Entre os extratos ativos observa-se que todos foram obtidos por alcalinização do pó da planta com hidróxido de amônio, seguida da extração, em aparelho de Soxhlet, com diclorometano (6 extratos ativos) e etanol (2 extratos ativos) (Tabela 36, pg. 135).

Tabela 36: Comparação das atividades antiplasmódicas dos extratos avaliados.

Extratos	CI ₅₀ (μg/mL) – W2
ATIVOS (CI ₅₀ < 10 μg/ml)	
ETOH-S de <i>A. olivaceum</i> (Cs)	5,0
DCL-S de <i>A. olivaceum</i> (Ca)	< 6,0
DCL-S de <i>A. olivaceum</i> (Cs)	< 6,0
DCL-S de <i>A. ramiflorum</i> (Fo)	< 6,0
DCL- S de <i>A. ramiflorum</i> (Cs)	< 6,0
DCL- S de <i>A. spruceanum</i> (Cs)	< 6,0
DCL-S de <i>A. olivaceum</i> (Fo)	7,0
ETOH- S de <i>A. olivaceum</i> (Fo)	7,0
MODERADAMENTE ATIVOS (CI ₅₀ 10 a 100 μg/mL)	
ETOH-P <i>E. febrifuga</i> (Ca)	15,5
ETOH-S de <i>A. ramiflorum</i> (Ca)	19,75
ETOH-P de <i>A. tomentosum</i> (Fr)	20,52
DCL- S de <i>A. spruceanum</i> (Fo)	23,25
ETOH-P de <i>A. tomentosum</i> (Fo)	23,75
ETOH-P de <i>A. tomentosum</i> (Se)	24,51
ETOH-S de <i>A. spruceanum</i> (Ca)	26,25
ETOH-P de <i>A. tomentosum</i> (Ca)	26,50
ETOH-S de <i>A. spruceanum</i> (Cs)	28,01
ETOH-P de <i>A. spruceanum</i> (Ca)	29,52
ETOH-P de <i>A. parvifolium</i> (Cs)	32,75
ETOH-P de <i>A. ramiflorum</i> (Fo)	32,8
ETOH-P de <i>A. ramiflorum</i> (Ca)	36,5
CLORO-P de <i>A. spruceanum</i> (Ca)	37,0
ETOH-P de <i>A. cylindrocarpon</i> (Fo-Cs)	44,0
ETOH-P de <i>A. spruceanum</i> (Fo)	65,0

Legenda: W2- resistente a cloroquina; CI₅₀- concentração inibitória 50%; ETOH-P: extrato etanólico obtido por percolação; ETOH-S- extrato etanólico obtido em aparelho de Soxhlet; DCL-S- extrato diclorometano obtido em aparelho de Soxhlet; CLORO-P extrato clorofórmico obtido por percolação; Ca- caules; Cs- cascas; Fo- folhas; Fr- frutos e Se- sementes.

As frações APT-1, APT-2 e APN-2, obtidas pela extração ácido-base do ETOH-P (Cs) de *A. parvifolium*, apresentaram atividade antiplasmódica para o clone W2. Já as demais frações mostraram atividade antiplasmódica moderada para o clone W2 (Tabela 37, pg. 136). O processo de extração ácido-base levou a frações/substâncias com maior atividade antiplasmódica, no caso de *A. parvifolium*, porém não foi observado melhora da atividade com o fracionamento de *E. febrifuga*.

Tabela 37: Comparação das atividades antiplasmódicas das frações avaliadas.

Fração	CI ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$) \pm DP	Classificação
APT-1	0,98 \pm 0,20	Ativo
APT-2	1,25 \pm 0,35	Ativo
APN-2	9,75 \pm 0,35	Ativo
APN-1	15,02 \pm 2,83	Moderadamente ativo
EFN	26,5 \pm 0,7	Moderadamente ativo
EFT	30,5 \pm 2,12	Moderadamente ativo

Legenda: CI₅₀= concentração inibitória 50%; DP= desvio padrão; APN-1- fração de neutros 1 (Figura 8); APN-2- fração de neutros 2 (Figura 9); APT-1- fração de alcalóides totais 1 (Figura 8); APT-2- fração de alcalóides totais 2 de *A. parvifolium* (Figura 9); EFN- *E. febrifuga* neutros; EFT- *E. febrifuga* alcalóides totais.

Do fracionamento do ETOH-P (Cs) de *A. parvifolium* isolou-se a uleína que foi ativa em *P. falciparum*. Do ETOH-P (Ca) de *E. febrifuga* foram isoladas: a skimmiamina (69), γ -fagarina (70) e flindersiamina (72) que foram moderadamente ativas; HMMA (100) e rutaevina (90) mostraram-se inativas para o clone W2 (Tabela 38, pg. 136).

Tabela 38: Comparação das atividades antiplasmódicas das frações avaliados.

Fração	CI ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$) \pm DP	Classificação
Uleína (18)	0,75 \pm 0,10	Ativo
Skimmiamina (70)	19,5 \pm 0,71	Moderadamente ativo
γ - Fagarina (71)	36,0 \pm 2,8	Moderadamente ativo
Flindersiamina (73)	95,0 \pm 4,21	Moderadamente ativo
HMMA (89)	>100	Inativo
Rutaevina (93)	>100	Inativo

Comparando-se o potencial antimalárico dos extratos ETOH-P (Cs) *A. parvifolium* e ETOH-P (Ca) *E. febrifuga*, frações e substâncias puras fica evidente que *A. parvifolium* (APT-1 e 2) parece superior a *E. febrifuga*. Ensaios in vivo deverão ser realizados.

8- CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, conclui-se que para obtenção de extratos com atividade antiplasmódica, a partir de espécies pertencentes ao gênero *Aspidosperma*, o melhor processo de extração é submeter o pó da planta ao tratamento com base, seguindo-se extração em aparelho de Soxhlet, com diclorometano. Para caracterização cromatográfica em CCDS, utilização de anisaldeído - ácido sulfúrico para revelação mostrou-se mais adequada do que o reagente Dragendorff, sendo observadas manchas azuis para os alcalóides indólicos. Para as análises em CLAE o uso de fase móvel com pH ácido mostrou-se mais adequada. A espécie com maior número de extratos com atividade antiplasmódica foi a *A. olivaceum*. O fracionamento do extrato etanólico de cascas de *A. parvifolium* levou a obtenção de uma fração alcaloídica e uma substância (uleína) com alto potencial antimalárico e bom índice de seletividade.

O estudo fitoquímico em CCDS do extrato etanólico de caules de *E. febrifuga*, frações e alcalóides isolados demonstraram que não ocorre revelação dos alcalóides com o Reagente de Dragendorff e estes não tiveram mancha característica com anisaldeído - ácido sulfúrico, porém, quando sob luz UV, observam-se manchas fluorescentes azuis relacionadas aos alcalóides. Estudos em CLAE não permitiram estabelecer as melhores condições cromatográficas para análise desta planta e seus produtos. A atividade antiplasmódica do extrato etanólico de caule desta planta, frações e substâncias isoladas, em geral, foi moderada. O ETOH-P (Ca) de *E. febrifuga* e frações apresentaram baixos índices de seletividade.

Em síntese, as frações de alcalóides totais de *A. parvifolium* (APT-1 e APT-2) apresentaram um elevado potencial a candidatos a desenvolvimento de um fitoterápico para o tratamento da malária.

9- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU e SILVA, M; OLIVEIRA, A.B.; SOUZA FILHO, J.D.; CHIARI, E.; BRAGA, F.C.; LOMBARDI, J.A. Isolamento de alcalóides de *Aspidosperma tomentosum* biomonitorado por teste *in vitro* contra *Trypanossoma cruzi*. **Anais da II Semana da Pós-graduação da UFMG**, 2002.

AGUILAR-GUADARRAMA, A.B.; RIOS, M.Y. Geranyl N-dimethylallylanthranilate, a new compound from *Esenbeckia yaaxhokob*. **Planta Medica**, v. 70(1), p.85-86, 2004.

ANDRADE-NETO, V.F.; POHLIT, A.M.; PINTO, A.C.; SILVA, E.C.; NOGUEIRA, K.L.; MELO, M.R.; HENRIQUE, M.C.; AMORIM, R.C.; SILVA, L.F.; COSTA, M.R.; NUNOMURA, R.C.; NUNOMURA, S.M.; ALECRIM, W.D.; ALECRIM, M.G.; CHAVES, F.C.; VIEIRA, P.P. *In vitro* inhibition of *Plasmodium falciparum* by substances isolated from Amazonian antimalarial plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102(3), p.359-366, 2007.

ANTONACCIO, L.D. Aspidofiline, the phenolic alkaloid of the *Aspidosperma pyriliifolium* Mart. **Journal of Organic Chemistry**, v.25, p.1262-1263, 1960.

ARNDT, R.R; BROWN, S.H.; LING, N.C.; ROLLER, P.; DJERASSI, C.; FERREIRA, J.M.; GILBERT, B.; MIRANDA, E.C.; FLORES, S.E.; DUARTE, A.P.; CARRAZZONI, E.P. Alkaloid studies- LVIII- the alkaloids of six *Aspidosperma* species. **Phytochemistry**, v.6, p.1653-1658, 1967.

BAGGIO, C.H.; MARTINI OTOFUJI, G.; SOUZA, W.M.; MORAES SANTOS, C.A.; TORRES, L.M.; RIECK, L.; ANDRADE MARQUES, M.C.; MESIA-VELA, S.

Gastroprotective mechanisms of indole alkaloids from *Himatanthus lancifolius*. **Planta Medica**, v.71(8), p.733-8, 2005.

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

BARROS-FILHO, B.A.; NUNES, F.M.; OLIVEIRA, M.C.F., MAFEZOLI, J.; ANDRADE-NETO, M; SILVEIRA, E.R.; PIRANI, J.R. Volatile constituents from *Esenbeckia almawillia* (Rutaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v.32,p. 817–821, 2004.

BARROSO, G.M.; GUIMARAS, E.F.; ICHASO, C.L.F.; COSTA, C.G.; PEIXOTO, A.L.; LIMA, H.C. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**. V.2. Imprensa Universitária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1986.

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

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

BOWN, D. **Encyclopedia of herbs & their uses**. Dorling, Kindersley, London, 1995.

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

BURNELL, R.H.; CASA, D.D. Alkaloids of *Aspidosperma vargasii* A.DC. **Canadian Journal Chemical**, v.45, p.89, 1967.

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

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

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

CHEVALIER, A. *The encyclopedia of medicinal plants*. Dorling Kindersley. London, 1996.

CORRÊA, M.P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil**. Rio de Janeiro, Ministério da Agricultura, 1984.

CRAGG, G.M.; NEWMANN, D.J. Anticancer agents from plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v.100, p72-79, 2005.

DESJARDINS, R.E.; CANFIELD, C.J.; HAYNES, J.D.; CHULAY, J.D. Quantitative assessment of antimalarial activity *in vitro* by a semiautomated microdilution technique. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.16 (6), p. 710-718, 1979.

DJERASSI, C.; ARCHER, A.A.P.G; GEORGE, T.; GILBERT, B.; ANTONACCIO, L.D. Alkaloids studies- XXX Isolation and constitution of three new *Aspidosperma* alkaloids: cylindrocarpia, cylindrocarpidina, and pyrofilidina. **Tetrahedron.**, v.16, p.212-223, 1961.

DJERASSI, C.; GEORGE, T.; FINCH, N.; LODISH, H.F.; BUDZIKIEWICH, H.; GILBERT, B. Mass spectrometry in structural and stereochemical problems V, Refractine and aspidofractine. **Journal of the American Chemistry Society**, v.48, p.1499-1501, 1962.

DJERASSI, C; ARCHER, A.A.; GEORGE, T.; GILBERT, B; SHOOLERY, J.N.; JOHNSON, L.F. Alkaloid studies. XXV. The structures of the *Aspidosperma* alkaloids cylindrocarpine and cylindrocarpidine. **Experientia**, v.16, p.532-4, 1960.

DOLABELA, M.F. **Triagem *in vitro* para atividade antitumoral e anti *Trypanossoma cruzi* de extratos vegetais, produtos naturais e substâncias sintéticas.** Belo Horizonte: Depto de Fisiologia e Farmacologia, ICB, UFMG, 1997. 130p. Dissertação de Mestrado.

DOLABELA, M.F; OLIVEIRA, S.G.; NASCIMENTO, J.M.; PERES, J.M.; WAGNER, H.; PÓVOA, M.M.; OLIVEIRA, A.B. *In vitro* Antiplasmodial Activity of Extract and Constituents from *Esenbeckia febrifuga*, a Plant Traditionally Used to Treat Malaria in the Brazilian Amazon. **Phytomedicine, no prelo**, 2008.

DREYER, D.L. Alkaloids, limonoids and furocoumarins from three Mexican *Esenbeckia* species . **Phytochemistry**, v.19 (5), p.941-944, 1980.

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

FALKENHAGEN, H.; KUZOVKINA, I.N.; ALTERMAN, I.E.; NIKOLAEVA, L.A.; STÖCKIGT, J. Alkaloid formation hairy roots and all cell suspension of *Rawolfia sepentina* Benth. **Journal of Natural Product Lett.**, v.3, p.107, 1993.

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

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

FERREIRA-NETO, W.M. *Aspidosperma Mart., norm. cons. (Apocynaceae): estudos taxonômicos*. Campinas, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, 1988. Tese de Doutorado.

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

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

GARCIA, E.F. **Triagem para atividade antitumoral de extratos de espécies vegetais das famílias Annonaceae, Combretaceae e Apocynaceae e isolamento biomonitorado de acetogeninas tera-hidrofuranônicas de Annona coriacea**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Minas Gerais, 2000.

GERASIMENKO, I.; SHELUDKO, Y.; UNGER, M.; STOCKIGT, J. Development of an efficient system for the separation of indole alkaloids by high performance liquid chromatography and its applications. **Phytochememical Analysis**, v.12(2), p. 96-103, 2001.

GIAO, P.de; VRIES, P.J. Pharmacokinetic interactions of antimalarial agents. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 40(5), p.343-73, 2001.

GILBERT, B.; ANTONACCIO, L.D.; ARCHER, A.A.P.G.; DJERASSI, C. Alkaloid studies XXIII. Isolation of four new *Aspidosperma* alkaloids: cylindrocarpine, refractine, pyrifoline and pyrifolidine. **Experientia**, v.16, p.61-62, 1960.

GILBERT, B.; DUARTE, A.P.; NAKAWAY, Y.; JOULE, J.A.; FLORES, S.E.; BRISSOLE, J.A.; CAMPELO, J.; CARRAZZONI, E.P.; OWELLEN, R.J.; BROSEY, E.C.; BROWN Jr., K.S.; DJERASSI, C. Alkaloids studies L-The alkaloids of twelve *Aspidosperma* species **Tetrahedron**, v.21, p.1141-1161, 1965.

GRANATO, D.; NUNES, D.S.; MATTOS P.P; RIOS, E.M.; GLINSKI, A.; RODRIGUES, L.C.; ZANUSSO JÚNIOR, G. Chemical and biological evaluation of rejects from the wood industry. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.48(spe), p.237-241, 2005.

GUILHON, G.M.S.P.; BAETAS, A.C.; MAIA, J.G.S.; CONSERVA, L.M. 2-alkyl-4-quinolone alkaloids and cinnamic acid derivatives from *Esenbeckia almawillia*. **Phytochemistry**, v. 37(4), p. 1193-1195, 1994.

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

HERNANDEZ, N.M.R.; PEREZ, C.D. Fungal activity of various alkaloids isolated from *Catharanthus roseus* G. Don. **Revista Cubana Medicina Tropical**, v.29(3), p.147-52, 1977.

JÁCOME, R.L.R.P. **Estudo químico de Zeyheria montana M. e Aspidosperma parvifolium A.DC. Quantificação, por CLAE de naftoquinonas isoladas de Z. montana.** Tese UFMG/ICEEx/DQ. Belo Horizonte, 1998, 157p.

JÁCOME, R.L.R; 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 (6), p.897-900, 2004.

JAZTOLD- HOWORKO, R.; MACHON, Z.; WILIMOWSKI, M.; WOJEWODZKI, W.; BARCZYNSKA, J.; KEDZIERSKA, L.; ORZECHOWSKA-JUZWENKO, K.; DUS, E.; RUTKOWSKA, M; SZELAG, A. Synthesis and evaluation of 9-hydroxy-5-methyl-(and 5,6-dimethyl)-6H-pyrido{4,3-b}carbazole-1{N-(dialkylamino)alkyl} carboxamides, a new promising series of antitumor olivacine derivates. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.37,p. 2445-2452, 1994.

JENSEN, J.B.; TRAGER, W. *Plasmodium falciparum* in culture: use of outdated erythrocytes and description of the candle jar method. **Journal Parasitology**, v. 63(5), p.883-6, 1977.

KAPADIA, G.J.; ANGERHOFER, C.K.; ANSA-ASAMOAH, R.. Akuammine: An Antimalarial Indolemonoterpane Alkaloid of *Picralima nitida* Seeds. **Planta Medica**,v.59, p. 565, 2001.

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

KUBO,I. Recent applications of counter-current chromatography to the isolation of bioactive natural products. **Journal Chromatography**, v.538, p.187-8, 1991.

LEEUWENBERG, A.J.M. The taxonomic position of some Genera in the *Loganiaceae*, *Apocynaceae* and *Rubiaceae*, related families which contain indole alkaloids. **Indole and bioenergetically related alkaloids**. Editores: J.D.Phillipson e M.H.Zenk. Editora: Academic Press, cap. 1, p.1-9, 1980

LE MÉE, S.; PIERRÉ, A.; MARKOVITS, J.; ATASSI, G.; JACQUEMIN-SABLON, A.; SAUCIER, J.M.. S16020-2, a New Highly Cytotoxic Antitumor Olivacine Derivative: DNA Interaction and DNA Topoisomerase II Inhibition. **Molecular Pharmacology**, v.53, p. 213, 1998.

LIKHITWITAYA WUID, K.; ANGERHOFER, C.K.; CORDELL, G.A.; PEZZUTO, J. M.; RUANGRUNGSI, N. Cytotoxic and Antimalarial Bisbenzylisoquinolme Alkaloids from *Stephania erecta*. **Journal of Natural Products**, v.56(1), p.30-38, 1993.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil**. Nova Odessa, SP: Editora Plantarum, 1992.

MACKINNON, S.; DURST, T.; ARNASON, J.YT.; ANGERHOFER, C.; PEZZUTO, J.; SANCHEZ-VINDAS, P.E.; POVEDA, J.L.; GBEASSOR, M.. Antimalarial activity of tropical Meliaceae extracts and gedunin derivatives. **Journal of Natural Products**, v.60(4), p.336-41, 1997.

MALLONE, H.; FARINELLE, S.; DECAESTECKER, C.; GORDOWER, L.; FONTAINE, J.; CHAMINADE, F.; SAUCIER, J.M.; ATASSI, G.; KISS, R.. *In vitro* and *in vivo* pharmacological characterizations of the antitumor properties of two new olivacine derivates, S16020-2 and S30971. **Clinical Cancer Research**, v.6, p.3774-3782, 2000.

MANSKE, R.H.; RODRIGO, R. **The alkaloids**. New York, Academic Press. 861p, 1965, v.VIII.

MARCONDES- FERREIRA, W.; KINOSHITA, L.S. Uma nova infragenérica para *Aspidosperma* Mart (Apocynaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v.19, p. 203-214, 1996.

MARINI, D.M.; CROS, S.; PAOLETTI, C.; LECOINTE, P.; HSIE, A.W. Mutagenicity and cytotoxicity of five antitumor ellipticines in mammalian cells and their structure-activity relationships in *Salmonella*. **Cancer Research**, v. 43, p. 3544 – 3552, 1983.

MARQUES, M.F.S.; KATO, L.; LEITÃO Fº, H.F.; REIS, F.A.M. Indole alkaloids from *Aspidosperma ramiflorum*. **Phytochemistry**, v.41(3), p.963-967, 1996.

MATA, R.; MACIAS, M.L.; ROJAS, I.S.; LOTINA-HENNSEN, B.; TOSCANO, R.A.; ANAYA, A.L., Phytotoxic compounds from *Esenbeckia yaxhoob*. **Phytochemistry**, v.49 (2), p. 441-449, 1998.

MELO, M.F.F.; ZICKEL, C.S. Os gêneros *Zanthoxylum* L. e *Esenbeckia* Kunth (Rutaceae) no estado de Pernambuco, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 18 (1), p. 73-90, 2004

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

MILLIKEN, W. **Plants for malaria or fever: medicinal species in Latin America-a bibliography survey. Kew: the Royal Botanic Gardens**. Monografia. The Royal Botanic Gardens, 27p., 1997.

MINISTÉRIO DA SAÚDE- BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso**. Brasília: Ministério da Saúde, 2005, 6 ed. rev., 320p.

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

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

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

MOBOT: MISSOURI BOTANICAL GARDEN. **W³ Tropics.** Disponível: <http://www.mobot.org/MOBOT/venguayana/apocynaceae/apidosperma.htm>. Acesso: 01/07/2007.

NAPOLITANO, H.B.; SILVA, M.; ELLENA, J.; RODRIGUES, B.D.G.; ALMEIDA, A.L.C.; VIEIRA, P.C.; OLIVA, G.; THIEMANN, O.H. Aurapten, a coumarin with growth inhibition against *Leishmania major* promatigostes. **Brazilian Journal Medical Biological Research**, v.37, p.1847-1852, 2004.

OLIVEIRA, F.M. *Isolamento e caracterização de constituintes químicos de raízes de *Esenbeckia grandiflora* (Rutaceae)* Dissertação de Mestrado em Química. Centro de Ciências Exatas e Naturais, Universidade Federal de Alagoas, Maceio, AL. 80p, 1995.

OLIVEIRA, F.M.; SANT'ANA, A.E.G.; CONSERVA, L.M.; MAIA, J.G.S. Alkaloids and coumarins from *Esenbeckia* species. **Phytochemistry**, v.41(2), p.647-649, 1996.

OLIVEIRA, A.B., DOLABELA, M.F.; POVOA, M.M ; BRAGA, F.C. Plants as source fo antimalarial phytopharmaceutics. **Academia Brasileira Ciências**, a ser submetido em 2008.

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

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

PHILLIPSON, J. D.; WRIGHT, C.W. Can ethnopharmacology contribute to the development of antimalarial agents? **Journal of Ethnopharmacology**, v.32, p.155-165, 1991.

PIRANI, J.R. Two new species of *Esenbeckia* (Rutaceae, Pilocarpinae) from Brazil and Bolivia. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 12, p. 305–313, 1999.

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

RANDRIANARIVELOJOSIA, M.; RASIDIMANANA, V.T.; RABARISON, H.; CHEPLOGOI, P.K; RATSIMBASON, M.; MULHOLLAND, D.A.; MAUCLÈRE, P. Plants traditionally prescribed to treat *tazo* (malaria) in the eastern region of Madagascar. **Malaria Journal**, v.2(1), p.25, 2003.

RIECKMAN, K.H.; SAX, L.J.; CAMPBELL, G.H.; MRENA, J.F. Drug sensitivity of *Plasmodium falciparum*. An *in vitro* microtechnique. **Lancet**, v.i, p.22-23, 1978.

RIOS, M.Y.; DELGADO, G. Furocoumarins, terpenes and sterols from *Esenbeckia ovata* Kunth (Rutaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v.30, p.697-699, 2002.

RIOS, M.Y.; ROSAS-ALONSO, E.; AGUILAR-GUADARRAMA, A.B. Alkaloids, coumarins and sesquiterpenes from *Esenbeckia conspecta* Kunt (Rutaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v.30, p. 367-369, 2002.

RIOS, M.Y.; AGUILAR-GUADARRAMA, A.B.; DELGADO, G. Furoquinoline alkaloids, furocoumarins and terpenes from *Esenbeckia litoralis* (Rutaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 30, p.977- 979, 2002.

RIOS, M.Y.; AGUILAR-GUADARRAMA, A.B. Terpene and new bishomotriterpene from *Esenbeckia stephani* (Rutaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 30, 1006-1008, 2002.

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

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

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

SCHRISPSEMA, J; DAGNINA, D.; GROSMAN, G. Alcalóides indólicos. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Organizadores: Simões, C.M.O.; Schenkel,

E.P.; Grasman, G.; Mello, J.C.P.; Ments, L.A.; Petrovick, P.R. Ed. Da UFSC e UFRCS, capítulo 31, p. 679-706, 1999.

SIMPSON, D.S.; JACOBS, H.. Alkaloids and coumarins from *Esenbeckia pentaphylla* (Rutaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 33, p. 841- 844, 2005.

SOUZA, A.C.M.; SOUZA,L.K.H.; SILVA, M.R.R.; OLIVEIRA, C.M.A.; KATO, L.; SILVA, C.C.; TANAKA, A.J.B. Propriedades antifungicas dos alcalóides de *Aspidosperma ramiflorum*. **29ª Reunião Anual Sociedade Brasileira de Química**, 2006.

SPERLING, H.; LORENZ, A.; KREGE, S.; ARNDT, R.; MICHEL, M.C. An extracts from the bark of *Aspidosperma quebracho-blanco* binds human penile alpha-adrenoceptors. **Journal Urology**, v.168 (1), p.160-163, 2002.

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

STÖCKIGT, J.; SHELUDK, Y.; UNGER, M.; GERASIMENKO, I.; WARZECHA, H.; STOCKIGT, D. High-performance liquid chromatographic, capillary electrophoretic and capillary electrophoretic- electrospray ionisation mass spectrometric analysis of selected alkaloids groups. **Journal Chromatography A**, v. 967 (1), p. 85-113, 2002.

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

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

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

TRANI, M.; DELLE MONACHE, F; DELLE MONACHE, G. Isopentenylindole derivatives and other components of *Esenbeckia leiocarpa*. **Gazzeta Chimica Italiana**, v.127, p.415, 1997.

TRANI, M.; CARBONETTI, A.; MONACHE, G.D.; MONACHE, F.D. Dihydrochalcones and coumarins of *Esenbeckia grandiflora* subsp. *brevipetiolata*. **Fitoterapia**, v. 75, p.99-102, 2004.

TIKHOMIROFF, C.; JOLICOEUR, M. Screening of *Catharanthus roseus* secondary metabolites by high-performance liquid chromatography. **Journal Chromatography A**, v. 955(1), p.87-93, 2002.

TWENTYMAN, P.R.; LUSCOMBE, M. A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity. **British Journal Cancer**, v. 56, p. 279-285, 1987.

VALENTIN, A.; BENOIT-VICAL, F.; MOULIS, C.; STANISLAS, E.; MALLIÉ, M.; FOURASTÉ, I.; BASTIDE, J.M. *In vitro* antimalarial activity of penduline, a bisbenzylisoquinoline from *Isopyrum thalictroides*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.41, p.2305–2307, 1997.

VERPOORTE, R.; RUIGROK, C.L.M.; SVENDSEN, A.B. Medicinal plants of Surinam II: Antimicrobial active alkaloids from *Aspidosperma marcgravianum*. **Planta Medica**, v.46, p.149-152, 1982.

VERPOORTE, R.; VAN BEEK, T.A.; THOMASSEN, P.H.; AANDEWIJEL, J.; SVENDSEN, A.B. Screening of antimicrobial activity of some plants belonging to the *Apocynaceae* and *Loganiaceae*. **J Journal of Ethnopharmacology**, 8(3): 287-302, Sep 1983.

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

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

WILLCOX, M.L.; BODEKER, G. Traditional herbal medicines for malaria. **British Medical Journal**, v. 329, p.1156 – 1159, 2004.

WRIGTH, C.W.; PHILLIPSON, J.D. Antiprotozoal agents from plant sources. **Planta Medica**, v.57, p.553-559, 1991.

WRIGHT, C.W.; ALLEN, D.; PHILLIPSON, J.D.; KIRBY, G.C.; WARHURST, D.C.; MASSIOT, G.; MEN-OLIVIER, L.L. *Alstonia* species: are they effective in malaria treatment? **Journal of Ethnopharmacology**, v.40, p. 41-45, 1993.

WRIGHT, C.W.; ALLEN, D.; CAI, Y.; CHEN, Z.; PHILLIPSON, J.D.; KIRBY, G.C.; WARHURST, D.C.; TITS, M.; ANGENOT, L. Selective antiprotozoal activity of some *Strychnos* alkaloids. **Phytotherapy Research**, v.8, p.149–152, 1994.

WOODSON, R.S. Studies in the Apocynaceae VIII. An interim revision of the genus *Aspidosperma* Mart & Zucc. **Annals Missouri Botanical Garden**. v.38, p.119, 1951.

10- ANEXOS

10.1- Anexo 1: Cromatogramas obtidos em análises em CLAE de extratos de espécies de *Aspidosperma* e uleína.

10.1.1- Cromatogramas do extrato etanólico de caule-folhas de *A. cylindrocarpon*.

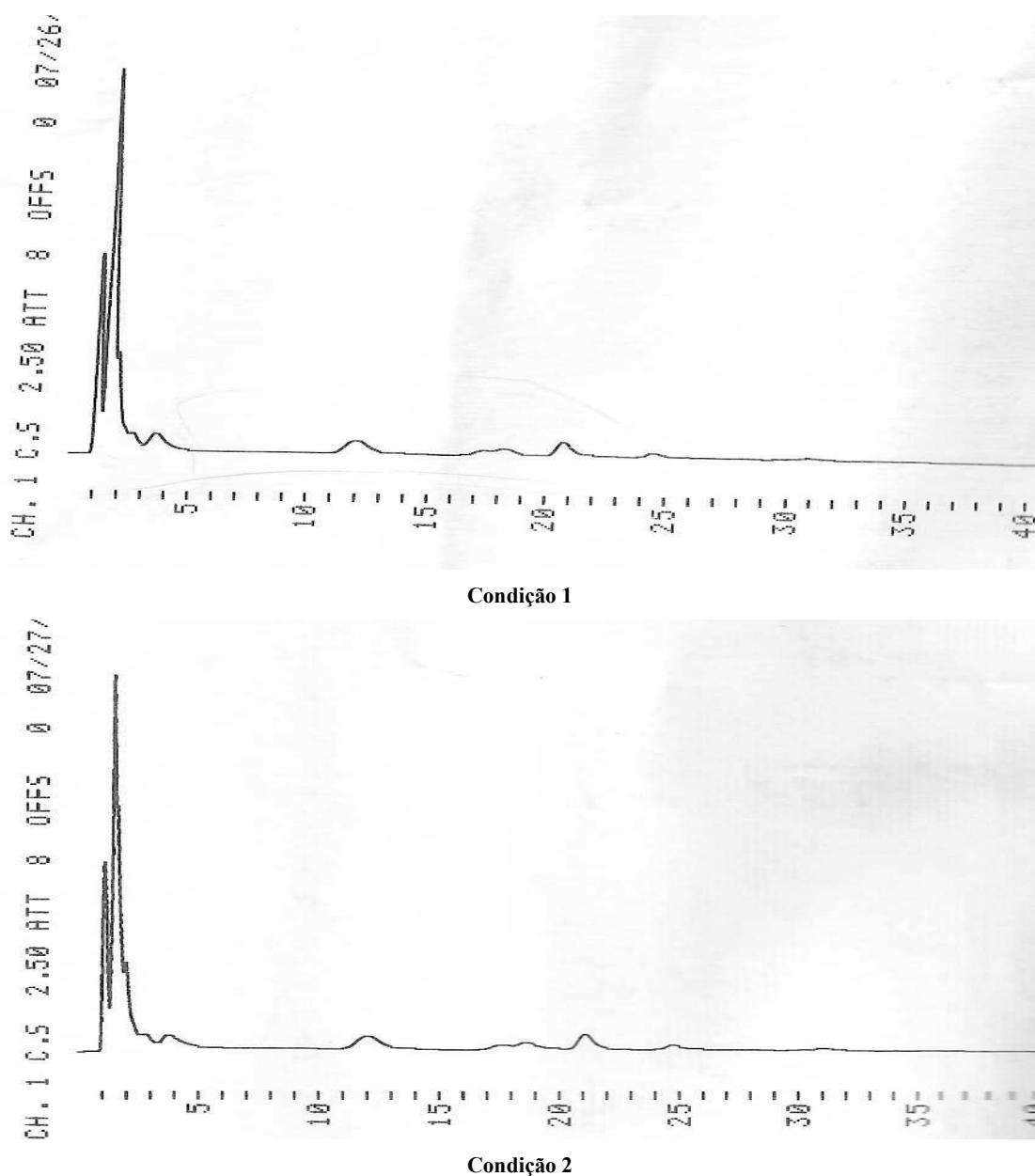
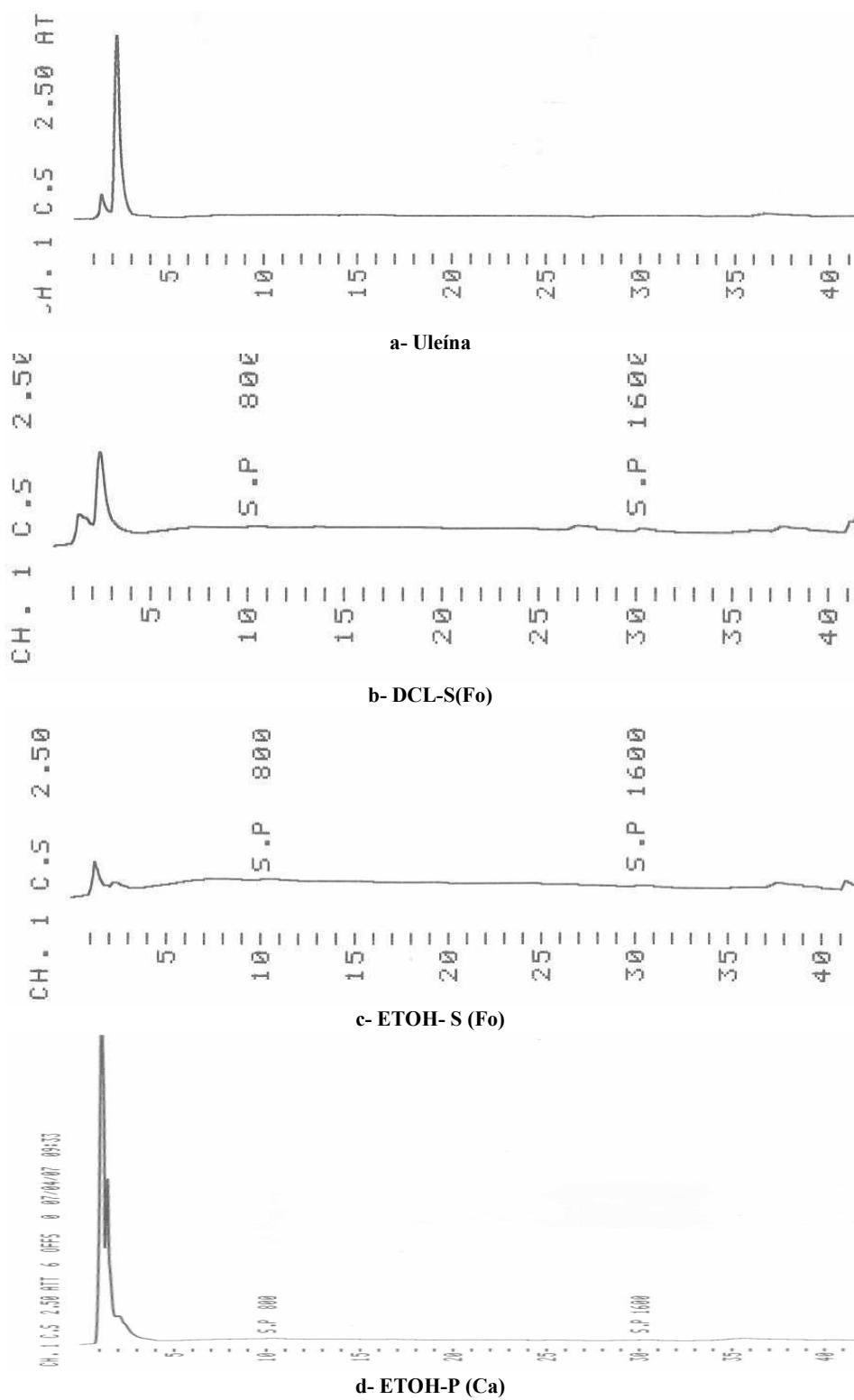


Figura 23: Perfis cromatográficos, obtidos por CLAE, do extrato etanólico de caule-folhas de *A. cylindrocarpon*.

Condição 1- Coluna RP18; Fase móvel: tampão fosfato pH 2,6 (A); Acetonitrila (B); Condição 2- Coluna RP-18; Fase móvel: tampão fosfato pH 2,6 + 2,5 mM de sal sódico de ácido hexanossulfônico (A); Acetonitrila (B). T= 0 min: 85% A: 15% B; T= 5 min: 80% A: 20% B; T= 30 min: 60% A: 40% B; T= 40 min: 20% A: 80% B; T= 50 min: 85% A: 15% B. Temperatura= 30° C; Fluxo= 1 mL/min; comprimento de onda 300 nm.

10.1.2- Cromatogramas de extractos de *A. olivaceum* e uleína.



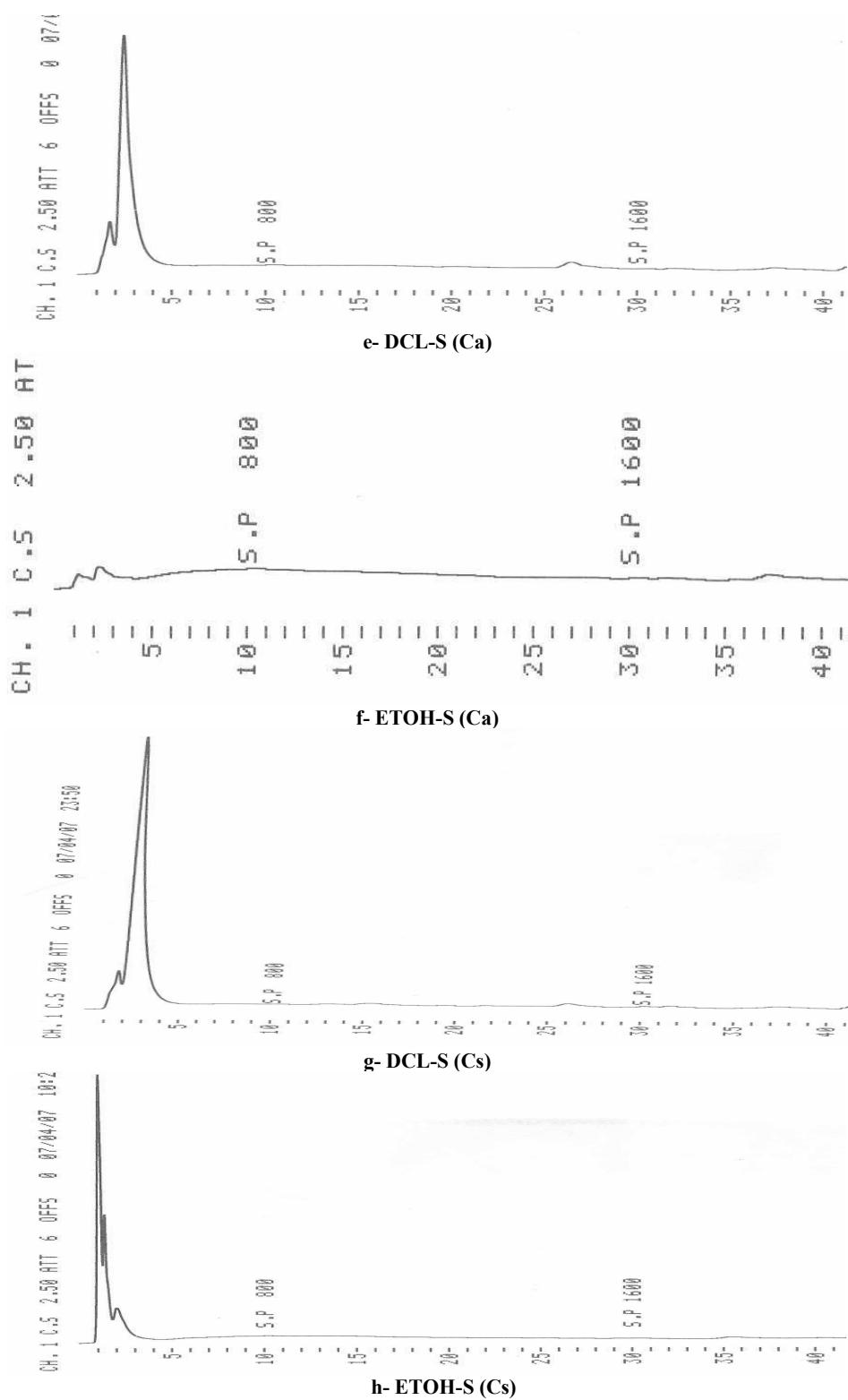
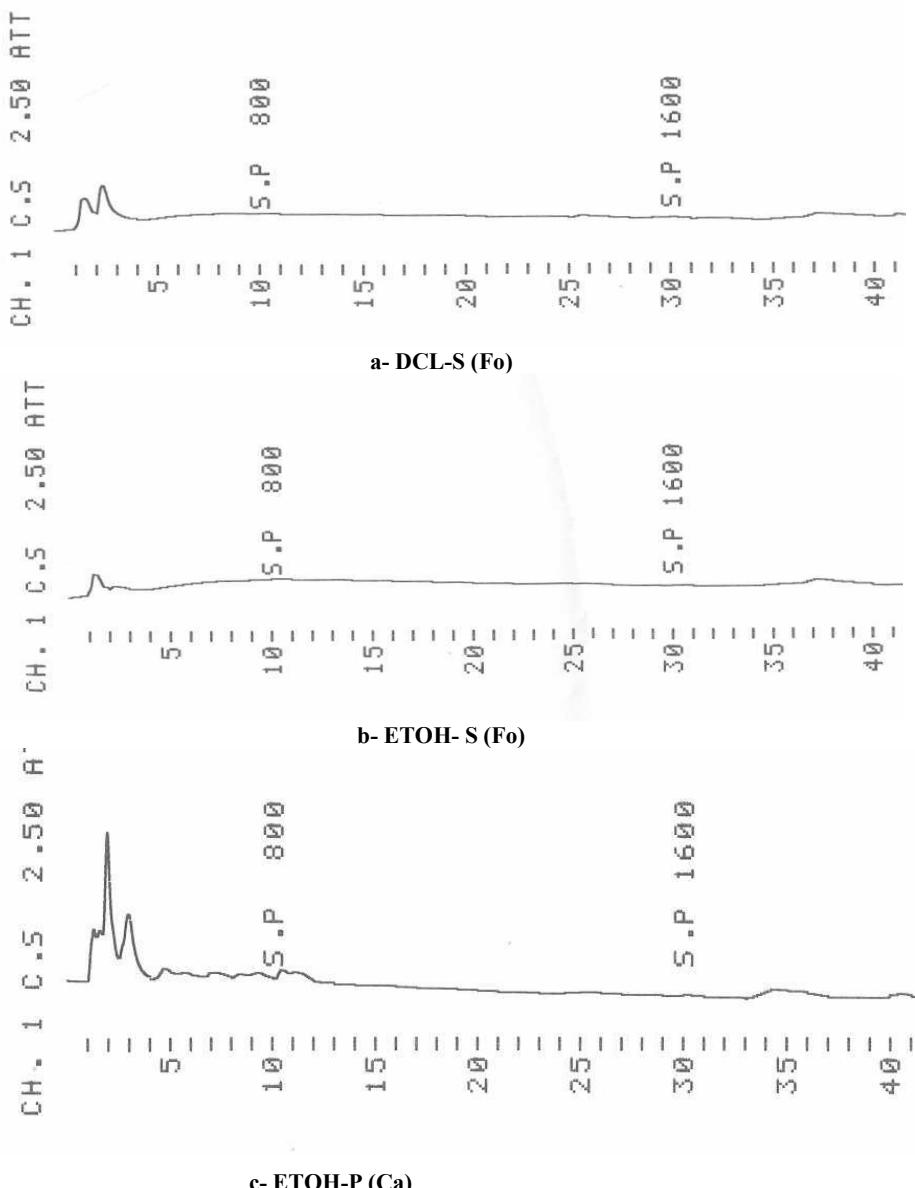


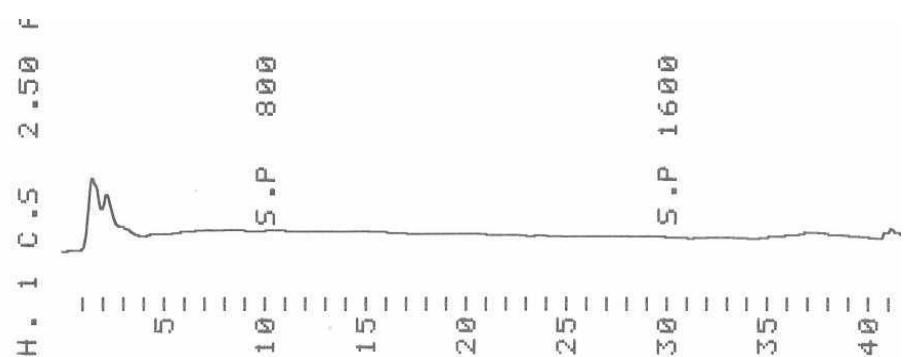
Figura 24: Perfis cromatográficos, obtidos por CLAE, dos extratos de *A. olivaceum*.

Condição: Fase móvel: tampão fosfato pH 2,6 (A); Acetonitrila (B). T= 0 min: 85% A: 15% B; T= 5 min: 80% A: 20% B; T= 30 min: 60% A: 40% B; T= 40 min: 20% A: 80% B; T= 50 min: 85% A: 15% B. Temperatura= 30° C; Fluxo= 1 mL/min; comprimento de onda 300 nm e coluna RP-18.

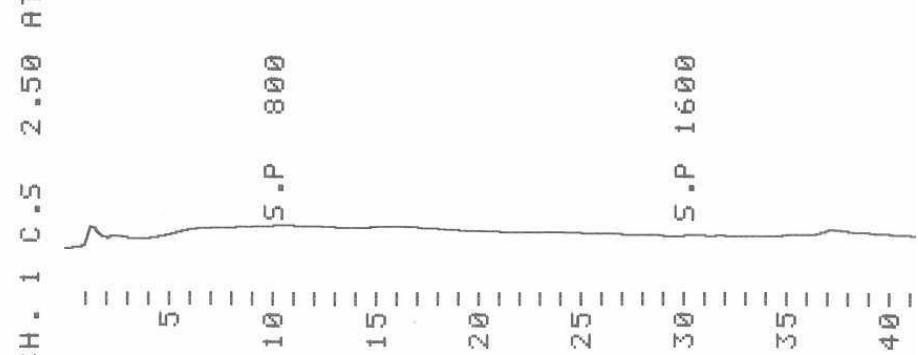
Legenda: a- ETOH-P (Fo)- extrato etanólico de folhas obtido por percolação; b- DCL-S (Fo)- extrato diclorometano de folhas obtido em aparelho de Soxhlet; c- ETOH-S (Fo)- extrato etanólico de folhas obtido em aparelho de Soxhlet; d- DCL-S (Ca)- extrato diclorometano de caules obtido em aparelho de Soxhlet; e- ETOH-S (Ca)- extrato etanólico de caules obtido em aparelho de Soxhlet; f- CLORO-P (Ca)- extrato clorofórmico de galhos obtido por percolação; g- ETOH-P (Cs)- extrato etanólico de cascas obtido por percolação; h- DCL-S (Cs)- extrato diclorometano de cascas obtido em aparelho de Soxhlet e i- ETOH-P (Cs)- extrato etanólico de cascas obtido em aparelho de Soxhlet.

10.1.3- Cromatogramas de extratos de *A. ramiflorum*.

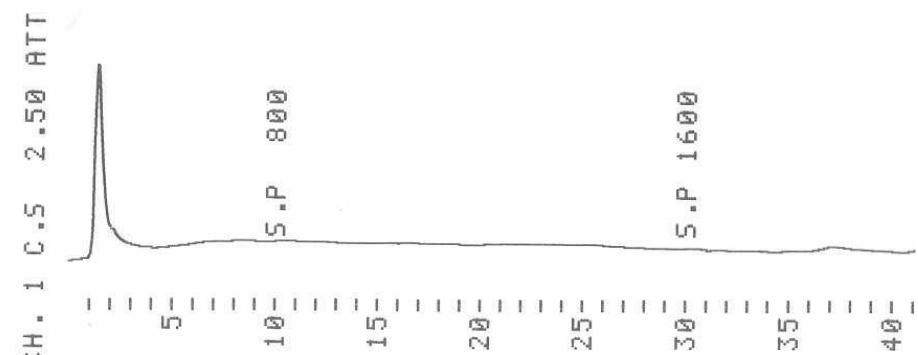




d- DCL-S(Ca)



e- ETOH-S (Ca)



f- DCL- S(Cs)

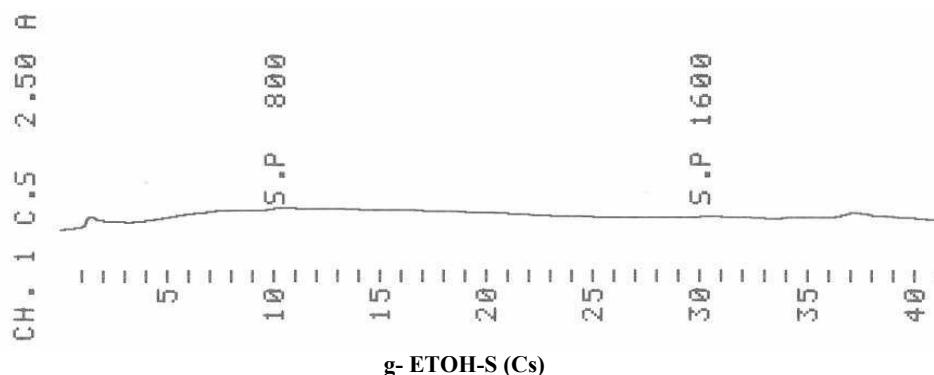
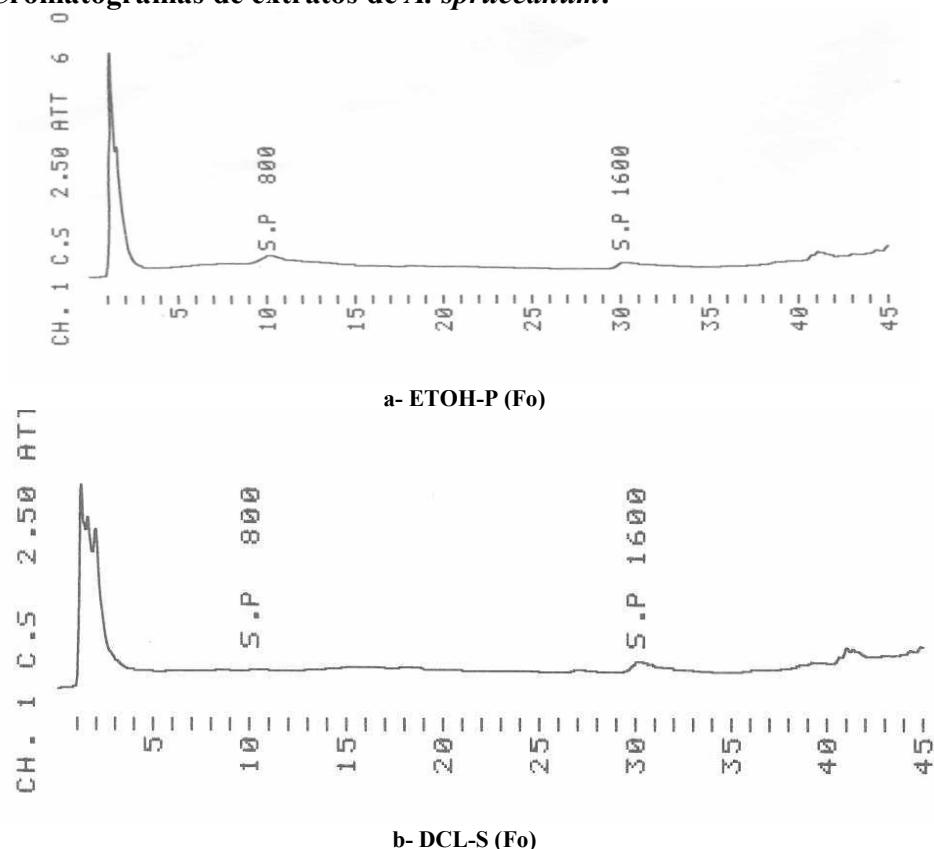
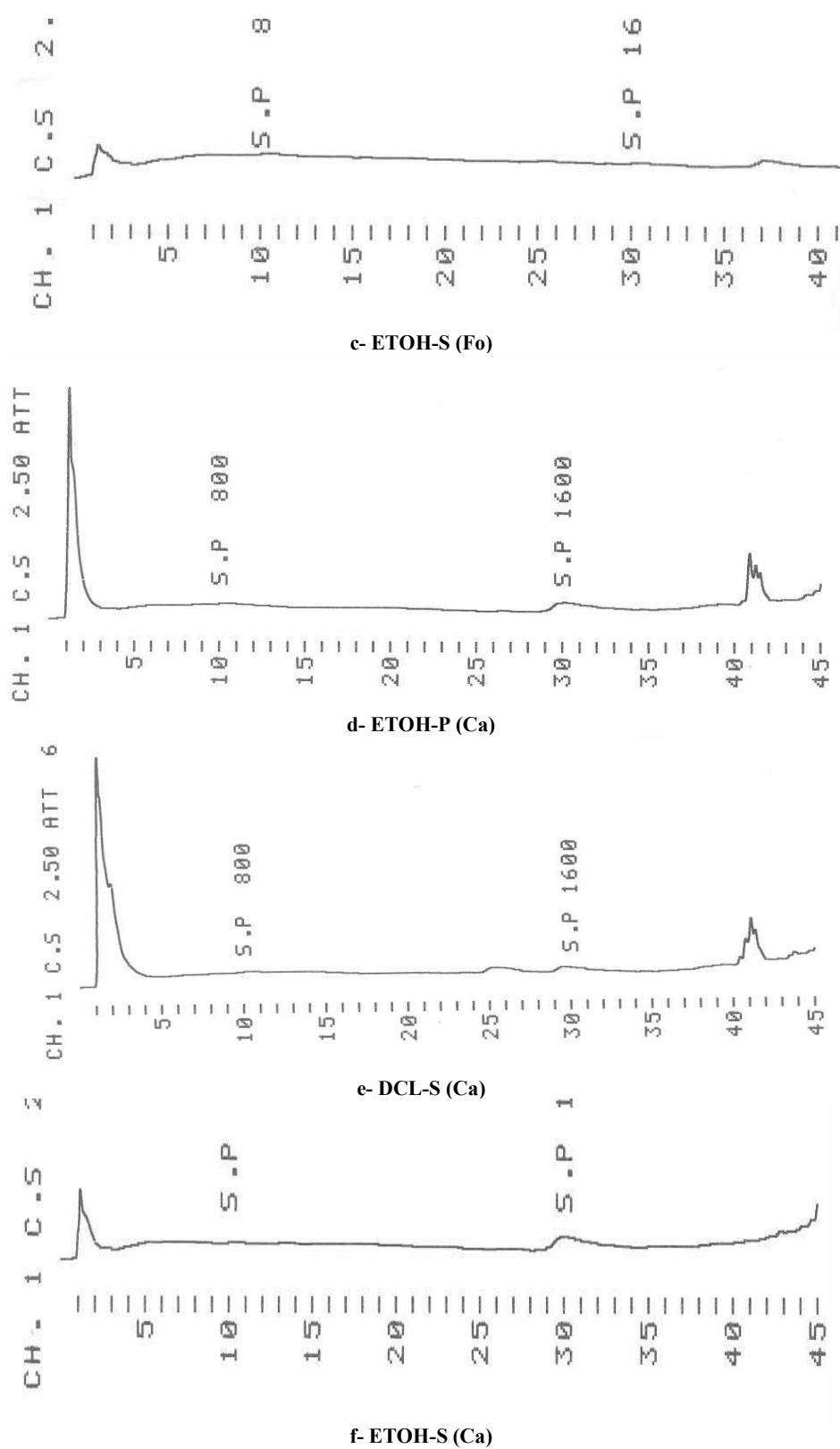


Figura 22: Perfis cromatográficos, obtidos por CLAE, dos extratos de *A. ramiflorum*. Condição: Coluna RP-18; Fase móvel: tampão fosfato pH 2,6 (A); Acetonitrila (B). T= 0 min: 85% A: 15% B; T= 5 min: 80% A: 20% B; T= 30 min: 60% A: 40% B; T= 40 min: 20% A: 80% B; T= 50 min: 85% A: 15% B. Temperatura= 30º C; Fluxo= 1 mL/min; comprimento de onda 300 nm.

Legenda: a- ETOH-P (Fo)- extrato etanólico de folhas obtido por percolação; b- DCL-S (Fo)- extrato diclorometano de folhas obtido em aparelho de Soxhlet; c- ETOH-S (Fo)- extrato etanólico de folhas obtido em aparelho de Soxhlet; d- DCL-S (Ca)- extrato diclorometano de caules obtido em aparelho de Soxhlet; e- ETOH-S (Ca)- extrato etanólico de caules obtido em aparelho de Soxhlet; f- CLORO-P (Ca)- extrato clorofórmico de galhos obtido por percolação; g- ETOH-P (Cs)- extrato etanólico de cascas obtido por percolação; h- DCL-S (Cs)- extrato diclorometano de cascas obtido em aparelho de Soxhlet e i- ETOH-P (Cs)- extrato etanólico de cascas obtido em aparelho de Soxhlet.

10.1.4- Cromatogramas de extratos de *A. spruceanum*.





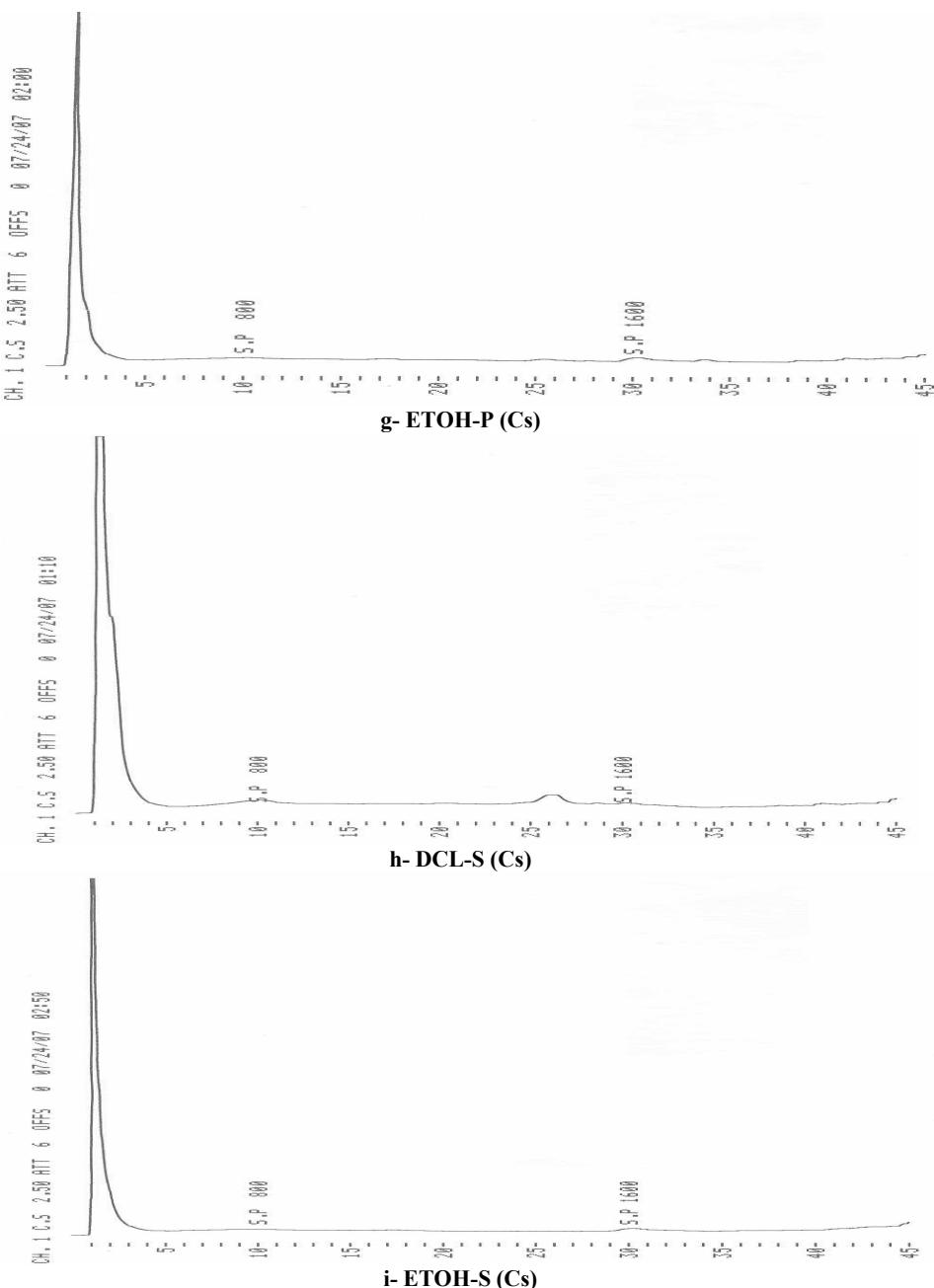
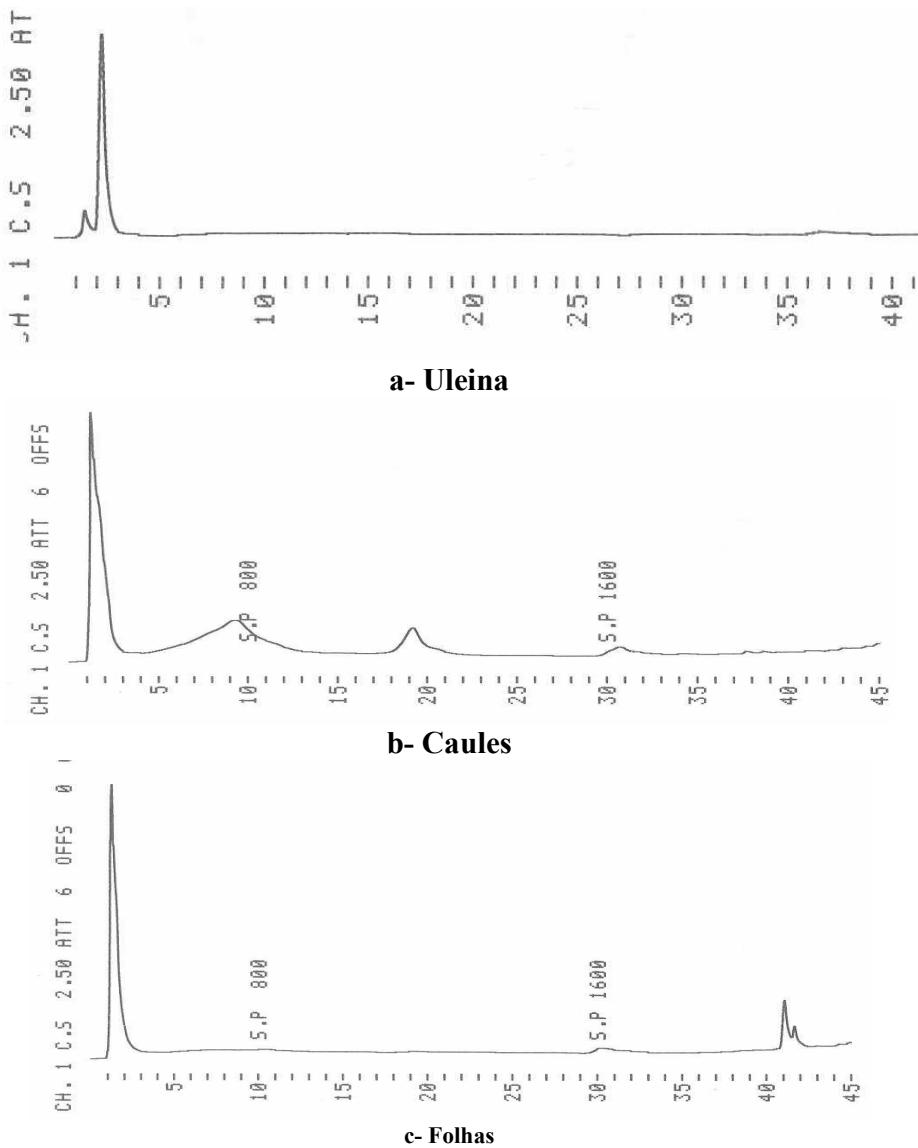


Figura 23: Perfis cromatográficos, obtidos por CLAE, dos extratos de *A. spruceanum*.

Condição: Coluna RP-18; Fase móvel: tampão fosfato pH 2,6 (A); Acetonitrila (B). T= 0 min: 85% A: 15% B; T= 5 min: 80% A: 20% B; T= 30 min: 60% A: 40% B; T= 40 min: 20% A: 80% B; T= 50 min: 85% A: 15% B. Temperatura= 30° C; Fluxo= 1 mL/min; comprimento de onda 300 nm.

Legenda: a- ETOH-P (Fo)- extrato etanólico de folhas obtido por percolação; b- DCL-S (Fo)- extrato diclorometano de folhas obtido em aparelho de Soxhlet; c- ETOH-S (Fo)- extrato etanólico de folhas obtido em aparelho de Soxhlet; d- DCL-S (Ca)- extrato diclorometano de caules obtido em aparelho de Soxhlet; e- ETOH-S (Ca)- extrato etanólico de caules obtido em aparelho de Soxhlet; f- CLORO-P (Ca)- extrato clorofórmico de galhos obtido por percolação; g- ETOH-P (Cs)- extrato etanólico de cascas obtido por percolação; h- DCL-S (Cs)- extrato diclorometano de cascas obtido em aparelho de Soxhlet e i- ETOH-P (Cs)- extrato etanólico de cascas obtido em aparelho de Soxhlet.

10.1.5- Cromatogramas de extractos de *A. tomentosum*.

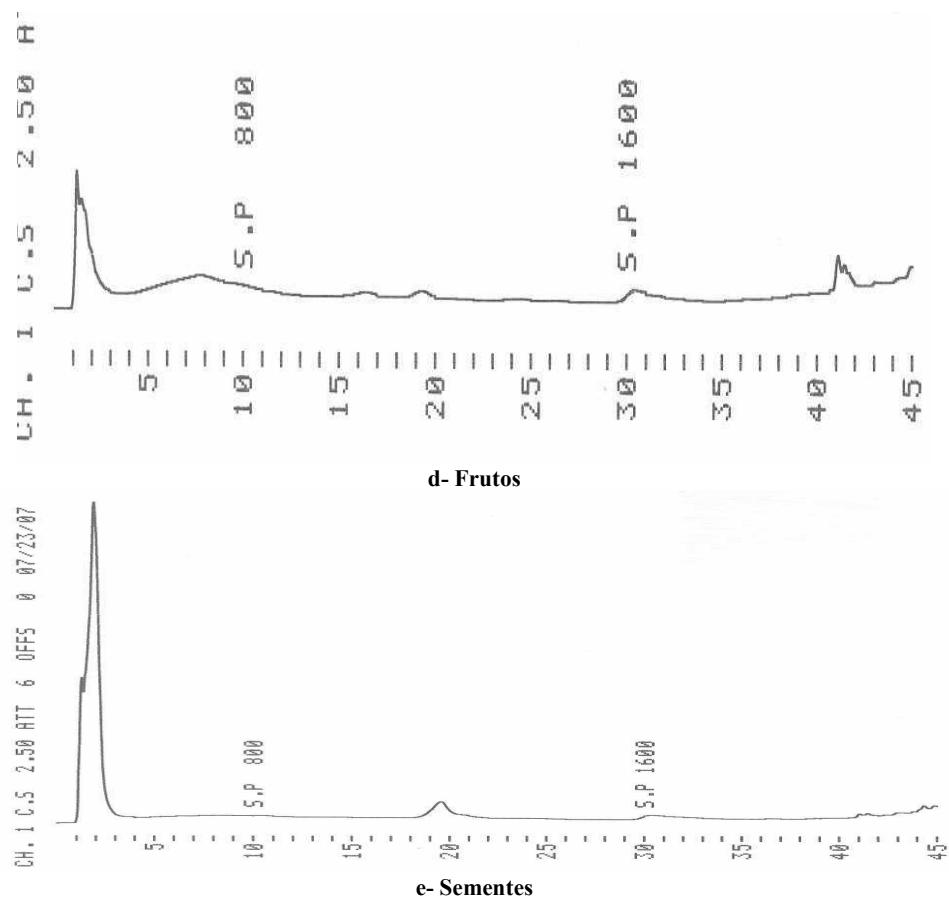


Figura 24: Perfis cromatográficos, obtidos por CLAE, dos extratos de etanólicos de *A.tomentosum*.
Condição: Fase móvel: tampão fosfato pH 2,6 (A): Acetonitrila (B). T= 0 min: 85% A: 15% B; T= 5 min: 80% A: 20% B; T= 30 min: 60% A: 40% B; T= 40 min: 20% A: 80% B; T= 50 min: 85% A: 15% B. Temperatura= 30° C; Fluxo= 1 mL/min; comprimento de onda 300 nm e coluna RP-18.

Anexo 2:**10.2- Artigo aceito na revista PHYTOMEDICINE**

***In vitro* Antiplasmodial Activity of Extract and Constituents from *Esenbeckia febrifuga*, a Plant Traditionally Used to Treat Malaria in the Brazilian Amazon**

Maria Fâni Dolabela,^o Salma G. Oliveira,[§] José Maria Souza Nascimento,[§] José Maria Veloso Peres,[§] Hildebert Wagner,[#] Marinete Marins Póvoa,[§] and Alaíde Braga de Oliveira^{*}

Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, 31270-901 Belo Horizonte , MG, Brazil; Laboratório de Malária, Instituto Evandro Chagas, BR 316, Km 7, Ananindeua, CEP 67030-070, PA, Brazil;. Fakultät für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität München, Butenandtstrasse 5-13, Haus F, Room F5.02681377 München-Grosshadern, Germany.

* To whom correspondence should be addressed. Tel: +55 31 3499 6972 Fax: +55 31 3499 6935

E-mail: alaidebraga@terra.com.br

^o Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG

[§] Instituto Evandro Chagas

[#] Ludwig-Maximilians-Universität München

Esenbeckia febrifuga (Rutaceae) is a plant traditionally used to treat malaria in the Brazilian Amazon region. Ethanol extract of stems displayed a good antiplasmodial activity against *Plasmodium falciparum* strains W-2 (IC_{50} $15.5 \pm 0.71 \mu\text{g/ml}$) and 3 D7 (IC_{50} $21.0 \pm 1.4 \mu\text{g/ml}$). Two coumarins (bergaptene 1 and isopimpinellin 2), five alkaloids (flindersiamine 3, kokusaginine 4, skimmianine 5, γ -fagarine 6 and 1-hydroxy-3-methoxy-*N*-methylacridone, 7), besides a limonoid (rutaevine 8), have been isolated by the first time from this species. Antiplasmodial activity of compounds 3, 5-8 has been evaluated *in vitro* against *P. falciparum* strains and the furoquinolines 5 and 6 were the most potent displaying IC_{50} values $<50 \mu\text{g/ml}$; flindersiamine (3) showed a weak activity while alkaloid 7 and rutaevine (8) were inactive ($IC_{50} >100 \mu\text{g/ml}$).

Malaria is one of the major parasitic diseases in the tropical and subtropical regions of the world and its aetiological agents are protozoans of the genus *Plasmodium*. It is responsible for over 1 million deaths each year and approximately 3.2 billion people, living in 107 countries, are presently at risk. Over 80% of malaria deaths occur in Africa and 15%, in Asia. In the Americas, 14% of the population is at risk although the mortality is relatively low in this region. The emergence of chloroquine resistant strains of *P. falciparum*, the most deadly species of malaria parasites, the resistance of vectors (*Anopheles* spp) to insecticides, in combination with poverty and lack of good quality health care, are the main causes for the increase of malaria morbidity and mortality.¹

In general, Brazil reports approximately 40% of the total number of malaria cases in the Americas, of which almost 99% occurs in the Legal Amazon Region, where 12% of the population of the country lives. An increase in the number of cases began in the 1980's and a peak of 610.878 cases has been reported in 2000. An improvement in the epidemiological situation in 2006 has been related to the Plan for Intensification of Control Measures in the Amazon (PICAM), initiated in 2000. In 2003, a National Program for Malaria Control (PNCM) was created by the Ministry of Health, an effort to strengthen the health services to provide conditions for rapid diagnosis, adequate treatment of the cases, control of vectors, fast detection of outbreaks and thus push on the measures to control malaria in the country (WHO, 2005). In 2001, a malaria network, the RAVREDA (Rede Amazônica de Vigilância da Resistência às Drogas Antimaláricas) was created and has gathered several American malarious countries, including Brazil. Besides monitoring the antimalarial drug resistance in the region, this network is also evaluating the susceptibility of the *Anopheles* vectors to insecticides. The Malaria Laboratory at Evandro Chagas Institute, state of Pará, under the coordination of Dr. Marinete M. Póvoa, is participating in this program for

evaluation of parasites drug resistance, diagnosis methods and quality, entomology and control of malaria vectors.²

There is a consensus that new drugs to treat malaria are urgently needed. Many approaches to antimalarial drug discovery are available.³⁻⁵ Investigation of plant-derived compounds is a valid strategy and this approach can benefit from traditional knowledge of populations from malarious regions. Natural products afforded two of the most important currently available drugs to treat malaria falciparum, quinine and artemisinin. The first one, a quinoline alkaloid, was isolated from *Cinchona* species used for treatment of fevers and/or malaria by South America Peruvian Indians and has been a template for the synthesis of chloroquine, the most widely used antimalarial drug. Artemisinin is responsible for the antimalarial activity of *Artemisia annua*, a species of millenar traditional use in China. The development of artemisinin derivatives has been a major advance in the chemotherapy of malaria.⁶

It is estimated that 80% of world's population depends on herbal remedies for treatment of diseases. Indeed, in malaria endemic areas, plant remedies are still widely used but mostly without assurance of their efficacy. Validation of traditionally used plants to treat malaria is important and requires clinical trials^{6,7} which must be preceded by phytochemical and toxicological studies that are necessary to guarantee efficacy and safety of herbal preparations (phytomedicines). Furthermore, knowledge of active compounds of a medicinal plant is important for development of standardized preparations for pre-clinical and clinical assays.

The genus *Esenbeckia* Kunth. (family Rutaceae, sub-family Rutoideae) includes ca 30 species natives to the tropical Americas⁸. Previous chemical studies on species of this

genus revealed the presence of typical rutaceous metabolites like coumarins, alkaloids, flavonoids, limonoids and terpenoids.⁸⁻¹⁵

Esenbeckia febrifuga (A. St.-Hil.) A. Juss. ex Mart., popularly known in Brazil as “quina-do-mato” and “tres folhas”, is used for the treatment of fever and/or malaria by inhabitants of the Brazilian Amazon region. An aqueous bark/stalk extract of this species has been previously assayed *in vivo* against *Plasmodium berghei* –infected mice, at a dose of 1.0 g/kg, and was shown to be partly active, causing 43% inhibition of parasite multiplication.^{16,17}

In this paper we report on the phytochemistry of *E. febrifuga* and the *in vitro* evaluation against *P. falciparum* of an ethanol extract from stems of this species, as well of five out of the eight compounds isolated. The susceptibilities were assessed against both chloroquine – sensitive (CQS) (3D7) and chloroquine - resistant (CQR) (W-2) strains of *P. falciparum*.

Results and Discussion

Phytochemical investigation of an ethanol extract from stems of *E. febrifuga*, collected at the municipality of Belo Horizonte, state of Minas Gerais, Brazil, led to the isolation of 2 coumarins (bergaptene 1and isopimpinellin 2), 4 furoquinoline alkaloids (flindersiamine 3, kokusaginine 4, skymmianine 5 and γ -fagarine (6), 1 acridone (1-hydroxy-3-methoxy-N-methylacridone, 7) besides a limonoid (rutaevine, 8).¹⁸ These compounds have been identified by comparison of physical and spectroscopic data with those reported in the literature and are described by the first time for this species. Recently, a new coumarin, named aurapten (7-geranyloxycoumarin), has been isolated from this

species and showed significant *in vitro* growth inhibition (IC_{50} of 30 μM) of *Leishmania major* promastigotes.¹⁹

The *in vitro* antiplasmodial activities of the crude ethanol extract and of isolated compounds against chloroquine - sensitive (CQS) (3D7) and chloroquine - resistant (CQR) (W-2) strains of *P. falciparum* are depicted in Table 1, together with those of the control drugs chloroquine and mefloquine. For comparison purposes, in the table are also included data previously reported for furoquinoline and acridone alkaloids from rutaceous plant species. Earlier studies by Basco et al.(1994)²⁰ on the *in vitro* activity of furoquinoline and acridone alkaloids reported the results on IC_{50} values expressed in $\mu\text{g/ml}$, the following criteria being adopted: $IC_{50}<10 \mu\text{g/ml}$, good activity; $IC_{50}>100 \mu\text{g/ml}$, inactive, IC_{50} of 10-50 $\mu\text{g/ml}$, moderate activity and IC_{50} of 50-100 $\mu\text{g/ml}$, low activity. However, more recently, Muriithi et al.(2002)²⁶ expressed the IC_{50} values in μM and has considered as inactive compounds showing $IC_{50}>100 \mu\text{M}$, of limited (moderate?) activity, compounds with IC_{50} of 1-20 μM and of low activity those acridones displaying IC_{50} of 20-60 μM . In this paper, the criteria considered by Basco et al. (1994)²⁰ are being adopted although the IC_{50} values are being expressed in μM .

Kokusaginine (4) and the coumarins 1and 2 were not tested. Of the five compounds assayed, skimmianine (5) was the most active against W-2 strain (CQR) with an IC_{50} value of $75.3 \pm 2.74 \mu\text{M}$ ($19.5 \pm 0.71 \mu\text{g/ml}$) which is higher then that reported previously for the same strain ($IC_{50} 54.4 \mu\text{M}$ or $14.1 \mu\text{g/ml}$), by the ^3H -hypoxanthine method.²⁰ γ -Fagarine (6) was more active against the 3D7 clone (CQS) ($IC_{50} 109.8 \pm 18.3 \mu\text{M}$ or $25.0 \pm 4.2 \mu\text{g/ml}$). γ -Fagarine (6) and skimmianine (5) displayed moderate activities against both W-2 and 3D7 strains ($IC_{50} 157.2 \pm 12.2$ and $166.0 \pm 5.4 \mu\text{M}$ or 36.0 ± 2.8 and $43.0 \pm 1.41 \mu\text{g/ml}$,

respectively) while flindersiamine (3) showed low activity against both clones (IC_{50} 348.0 \pm 35.8 and 265.6 \pm 12.8 μM or 95.0 \pm 4.2 and 72.5 \pm 3.5 $\mu\text{g/ml}$, respectively). Acridone 7 and rutaevine (8) were inactive ($IC_{50} > 100 \mu\text{M}$) against the assayed *P. falciparum* clones. The most active furoquinolines 5 and 6 showed relatively weak antiplasmodial effect compared to chloroquine and mefloquine (Table 1).

Euroquinoline and acridone alkaloids have been isolated from plants belonging to the Rutaceae family.^{21,22} Earlier studies reported the activity of several acridone alkaloids against *P. yoelli* both *in vitro* and *in vivo*^{23,24} as well the *in vitro* activity of furoquinolines and acridones against *P. falciparum*.²⁰

The results obtained for the furoquinolines 3, 5 and 6, are consistent with those reported by Basco et al. (1994)²⁰ and other recent publications on the antiplasmodial activity of rutaceous alkaloids. Skimmianine(5), γ -fagarine (6) and dictamine (9) were isolated from *Zanthoxylum tsahanimposa*, a bitter Rutaceae endemic to Madagascar, whose leaf and bark decoctions are used alone or in mixture with other plants for treatment of malaria. The IC_{50} values of these alkaloids against the FcM29 strain of *P. falciparum* (CQR) were of 134.3, 98.4 and 332.1 μM (30.0, 25.0 and 66.0 $\mu\text{g/ml}$), respectively, 5 and 6 being thus significantly more potent than 9.²⁵ In comparison with data²⁵ for the FcM29 strain, lower IC_{50} values have been observed for skimmianine (5) against W-2 strain (CQR), in the present investigation (IC_{50} 75.3 \pm 2.74 μM or 19.5 \pm 4.2 $\mu\text{g/ml}$), and earlier by Basco et al. (1994)²⁰ (IC_{50} 54.4 μM or 14.1 $\mu\text{g/ml}$) while γ -fagarine (9) displayed a higher IC_{50} value (157.2 \pm 12.2 μM or 36.0 \pm 2.8 $\mu\text{g/ml}$) and the 3D7 strain showed similar susceptibility as FcM29 (IC_{50} 109.8 \pm 8.3 μM versus 98.4 μM or 25.0 \pm 4.2 $\mu\text{g/ml}$ versus 25.5 $\mu\text{g/ml}$). Skimmianine (5) was one of the antiplasmodial alkaloids from *Teclea*

trichocarpa (Rutaceae), a species used in Kenyan traditional medicine for various purposes, including treatment of malaria. It showed a moderate activity against HB3 (CQS) and K1 (CQR) strains of *P. falciparum* (IC_{50} 47.5 ± 0.42 and 59.0 ± 0.32 μM , respectively).²⁶

So far, the most potent antiplasmodial furoquinoline alkaloid yet described is acronydine (10) which showed an IC_{50} of $7.0 \mu\text{M}$ ($2.18 \mu\text{g/ml}$) against W-2 strain. It is proposed that the pyran ring would be important for enhancing the antiplasmodial activity of furoquinolines, similarly as it is considered for acridone alkaloids.²⁰

The only acridone alkaloid isolated from *E. febrifuga*, in the present investigation, was 1-hydroxy-3-methoxy-N-methyl-acridone,⁷ obtained previously from callus cultures of *Ruta graveolens* (Rutaceae)^{27,28} and whose occurrence is reported in Mexican *Esenbeckia* species⁸ besides *Fagara macrophylla* (Rutaceae).²⁹ This acridone (8) was inactive against 3D7 and W-2 strains ($IC_{50} > 100 \mu\text{M}$) what is a surprise when compared to arborinine (11) which presents only one more methoxy group and showed a good activity against HB3 and K1 strains of *P. falciparum* (IC_{50} 3.85 ± 0.11 and $9.34 \pm 0.37 \mu\text{M}$ or 0.98 ± 0.39 and $2.38 \pm 1.30 \mu\text{g/ml}$, respectively). However, melicopicine (1,2,3,4-tetramethoxy-N-methylacridone) (12) was inactive and normelicopicine (13), the 1-demethyl derivative of melicopicine, has shown good activity against both the strains (IC_{50} 8.25 ± 0.12 and $14.7 \pm 0.26 \mu\text{M}$, respectively) what led the authors to suggest that the presence of a 1-hydroxyl group in these compounds is essential for the antiplasmodial activity.²⁶ An opposite effect was observed for a series of pyranoacridones for which the presence of a chelated hydroxyl group resulted in a complete loss of antiplasmodial activity and the methoxy group in the same position was crucial for the activity.²⁰ As previously observed, these contradictory

observations are indicating that structure-activity relationships in acridone alkaloids are rather complex.²⁶

Conclusion. This study reports by the first time the phytochemistry of *E. febrifuga* which was shown to contain both furoquinoline (3-6) and acridone (7) alkaloids, besides coumarins(1-2) and a limonoid (rutaevine) (8) and the evaluation of the antiplasmodial *in vitro* activity of an ethanol extract from the stems of this species as well of compounds 3, 5-8. The antiplasmodial furoquinoline alkaloids skimmianine (5), γ -fagarine (6), flindersiamine (3) and kokusaginine (4), the last one not tested but its activity was previously described (W-2 strain, 29.7 μ M; HB3 strain, 89.2 μ M)²⁰ are responsible, at least in part, for *E. febrifuga* activity, and would explain the traditional use of this plant to treat malaria in the Brazilian Amazon region. However, it does not preclude the presence of other active constituents in the aqueous extract which has been shown to be partly active *in vivo* against *P. berghei* – infected mice.¹⁶ Therefore, non isolated chemical constituents may have higher activity and/or synergistic effects would be taking place. As far as we are concerned the evaluation of the antiplasmodial activity of 7 and 8 is reported here by the first time. Some acridone alkaloids occurring in other rutaceous plants disclosed good antiplasmodial activity but 7, the only one isolated from *E. febrifuga*, was assayed by the first time and was inactive. Rutaevine (8), a limonoid, occurs in some species of *Esenbeckia*.⁸ Further studies are needed for validation of this Brazilian traditional remedy.

Experimental Section

Isolation of chemical constituents. Stems of a tree growing at *Campus Pampulha* - UFMG, Belo Horizonte, state of Minas Gerais, Brazil, were collected and dried at 50° C, in an oven with circulating air. A voucher specimen is deposited at the BHCB - UFMG (number 3825). Powdered stems (1.3 kg) were exhaustively extracted by percolation with EtOH; the combined extracts were concentrated in rotavapor and dried under vacuum to afford 92 g of the crude extract. Chromatography of this extract (75 g), on a silica gel column (Merck 60 (0.040-0.063 mm) eluting initially with hexane – chloroform (80:20) and then increasing the proportions of chloroform followed by chloroform, then chloroform with increasing proportions of methanol, and finally with methanol, led to fractions which were combined according to the similarity on TLC (Merck 60 G) profiles. Repetition of the chromatographic separations and crystallization led to the isolation of compounds 1-8 which were identified by analysis of their spectrometric data. Mass spectra were recorded at 70eV on a Kratos MS80 RFA (Manchester, UK). NMR spectra were recorded on chloroform-d (compounds 1-7) and on DMSO-d₆ (8) on a Bruker AM-360 (360.136 MHz) and on a JEOL GSX 400 N (3999.65 MHz), at Fakultät für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität, Munich, Germany.¹⁸

Antiplasmodial Assay. Parasite strains were kept in continuous cultures in human erythrocytes suspended in RPMI 1640 supplemented with 10% human serum according to the method described by Trager and Jensen(1976).³⁰ The antiplasmodial activity of the extract and test compounds was performed in 96-well tissue culture plates as described by Rieckman et al.(1978)³¹ with modifications reported by Carvalho et al.(1991).¹⁶ Twofold serial dilutions of test samples dissolved in sterile methanol were placed in microtiter plates and diluted with culture medium (RPMI 1640 plus 10% human serum). A suspension of

parasitized erythrocytes (0.5%-1% parasitaemia, 2.5% hematocrit) containing mainly trophozoites was added to the wells to give a final volume of 100 µl. Chloroquine was used as positive control and uninfected and infected erythrocytes were included as negative controls. The plates were incubated at 37° C and after 24 and 48 h the culture medium was replaced with fresh medium with or without test samples. Samples were taken 24 h later, smeared, Giemsa stained and microscopically examined to determine the percentage of parasitaemia by counting 5,000 erythrocytes. The results were expressed as the means IC₅₀ of 3 independent experiments for each sample. The Student's t test was used to compare the inhibition of the two different *P. falciparum* strains.

Acknowledgements. To Dr. Luzia H. Carvalho, Laboratory of Malaria, Centro de Pesquisas Renée Rachou, FIOCRUZ, Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil, for *P. falciparum* strains (3D7 and W-2) and for kindly supporting the Doctorate student Maria Fâni Dolabela with protocols for *P. falciparum* culture, *in vitro* assays and for valuable discussions. Research Fellowship (IA) by CNPq to ABO is fully aknowledegd.

References and Notes

- (1) WHO – World Health Organization, *World Malaria Report, 2005*.
<http://www.who.int/malaria>
- (2) MS/SVS - Ministério da Saúde/ Secretaria de Vigilância Sanitária, *Situação epidemiológica da malária no Brasil*: Brasília, 2007.
- (3) Ridley, R.G. *Nature* **2002**, *415*, 686-693.
- (4) Rosenthal, P.J. *J. Exp. Biol.* **2006**, *3735-3744*.

- (5) Fidock, D.A., Rosenthal, P.J., Croft, S.L., Brun, R. and Niwaka, S. *Na. Rev. /Drug Discov.* **2004**, *3*, 509-520.
- (6) Wright, C.W. *Phytochem. Rev.* **2005**, *4*, 55-61.
- (7) Willcox, M.L. and Bodeker, G. *Bri. Med. J.* **2004**, *329*, 156-1159.
- (8) Dreyer, D.L. *Phytochemistry* **1980**, *19*, 941-944.
- (9) Dreyer, D.L., Pickering M.V. and Cohan, P. *Phytochemistry*, **1972**, *11*, 705-713.
- (10). Rios, M.Y and Delgado, G. *J. Nat. Prod.* **1992**, *55*, 1307-1309.
- (11) Oliveira, F.M., Santana, A.E.G., Conserva, L.M., Maia, J.G. and Guilhon, G.M.P. *Phytochemistry* **1996**, *41*, 647-649.
- (12) Rios, M.Y. and Delgado, G. *Phytochemistry* **1992**, *31*, 3491-3494.
- (13) Trani, M., Carbonetti, A., Delle Monache, G. and Delle Monache, F. *Fitoterapia*, **2004**, *75*, 99-102.
- (14) Rios, M.Y., Aguilar-Guadarrama, A.B. and Delgado, G. *Biochem. Syst. Ecol.* **2002**, *30*, 977-979.
- (15) Bevalot, F., Fournet, A., Moretti, C. and Vaquette, J. *Planta Med.* **1984**, *50*, 522-523.
- (16) Carvalho, L.H., Brandão, M.G.L., Santos-Filho, D., Lopes, J.L.C. and Krettli, A.U. *Braz.J. Med. Biol. Res.* **1991**, *24*, 1113-1123.
- (17) Brandão, M.G.L., Grande, T.S.M., Rocha, F.M.M., Sawyer, D.R. and Krettli, A.U. *J. Ethopharmacol.* **1992**, *36*: 175-182.
- (18) Isolation and identification of chemical constituents from *E. febrifuga* stems were carried out at Fakultät für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität, Munich, Germany, as part of an International Cooperation Project within the CNPq (Brazil)/DLR(Germany) agreement.

- (19) Napolitano, H.B., Silva, M., Ellena, J., Rodrigues, B.D.G., Almeida, A.L.C., Vieira, P.C., Oliva, G. and Thiemann, O.H. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **2004**, *37*, 1947-1852.
- (20) Basco, L.; Mitaku, S.; Skaltsounis, A.-L.; Ravelomanantsoa, N.; Tillequin, F.; Koch, M.; Le Bras, J. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1994**, *38*, 1169-1171.
- (21) Silva, M.F.G.F.; Gottlieb, O.R.;d Ehrendorfer, F. *Plant. Syst. Evol.* **1988**, *161*, 97-134.
- (22) Waterman, P.G., *Biochem. Syst. Ecol.* **1999**, *27*, 395-406.
- (23) Fujioka, H., Kato, N., Fujita, M., Fujimura, K. and Nishiyama, Y. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* **1990**, *40*, 1026-1029.
- (24) Fujioka, H. Nishiyama, Y, Furukawa, H. and Kumada, N. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1989**, *33*, 6-9.
- (25). Randrianarivelojosia, M., Rasidimanana, V.T., Rabarison, H., Cheplogoi, P.K., Ratsimbason, M., Mulholland, D. and Mauclère, P. *Malaria J.* **2003**, *2*, 25.<http://www.malariajournal.com/content/2/1/25>
- (26) Muriithi, M.W., Abraham, W.R., Addae-Kyereme, J., Scowen, I., Croft, S.L., Gitu, P. M., Kendrick, H., Njagi, E.N.M. and Wright, C.W. *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 956-959.
- (27) Baumert, A., Kuzovkina, I.N., Krauss, Hieke, G.M. and Gröger, D. *Plant Cell Rep.* **1982**, *1*, 168-171.
- (28) Kuzovkina, I., Al'terman, I. and Schneider, B. *Phytochemistry* **2004**, *65*, 1095-1100.
- (29) Spatafora, C. and Tringali, C. *Phytochem. Anal.* **1997**, *8*, 139-142.
- (30) Trager, W. and Jensen, J. B. *Science* **1976**, *193*, 673-675.
- (31).Rieckman, K. H. *Susceptibility of cultured parasites of Plasmodium falciparum to antimalarial drugs. In:* World Health Organization (Editor), *Tropical Diseases Research Series III. The In Vitro Cultivation of Pathogens of Tropical Diseases*. Schwabe & Co. AG., Geneva, 1980, p 35-50.

Table 1. *In vitro* activities of extract and compounds **3**, **5-8** from *Esenbeckia febrifuga* against *Plasmodium falciparum* strains and some literature data.

	Activity against <i>P. falciparum</i> , IC ₅₀ μM						
	Plasmodium falciparum strains						
	3D7 ^a	W-2 ^a	W-2 ^b	HB3 ^b	HB3 ^c	K1 ^c	FcM29 ^d
<i>E. febrifuga</i> Extract	21.0 ± 1.4*	15.5 ± 0.71*					
Compounds							
Flindersiamine 3	265.6 ± 12.8	348.0 ± 35.3					
Kokusaginine 4			29.7	89.2	60.6		
Skimmianine 5	166.0 ± 5.4	75.3 ± 2.7	54.4	60.6	47.5±0.42	59.0 ± 0.32	134.3
g-Fagarine 6	109.8 ± 18.3	157.2 ± 12.2					98.4
Alkaloid 7	>100	>100					
Rutaevine 8	>100	>100					
Dictamine 9							332.1
Acronydine 10			7.0	38.9			
Arborinine 11					3.85 ± 0.11	9.34 ± 0.37	
Melicopicine 12			95.9	188.1	>100	>100	
Normelicopicine 13					8.25 ± 0.12	14.7 ± 0.26	
Chloroquine	0.0013	0.023					

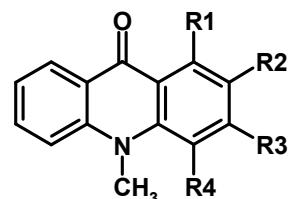
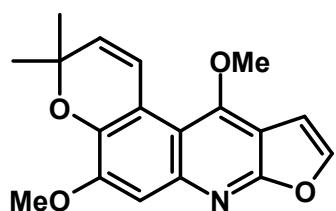
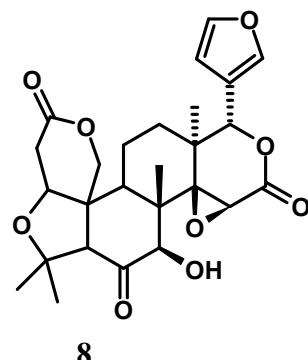
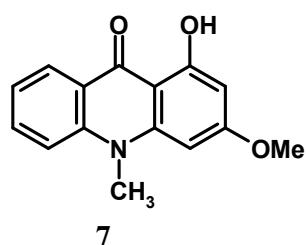
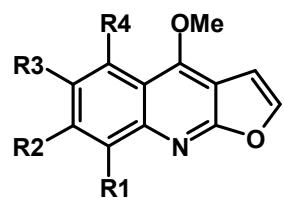
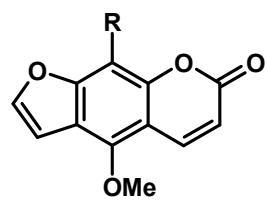
*: μg/ml

a: This paper

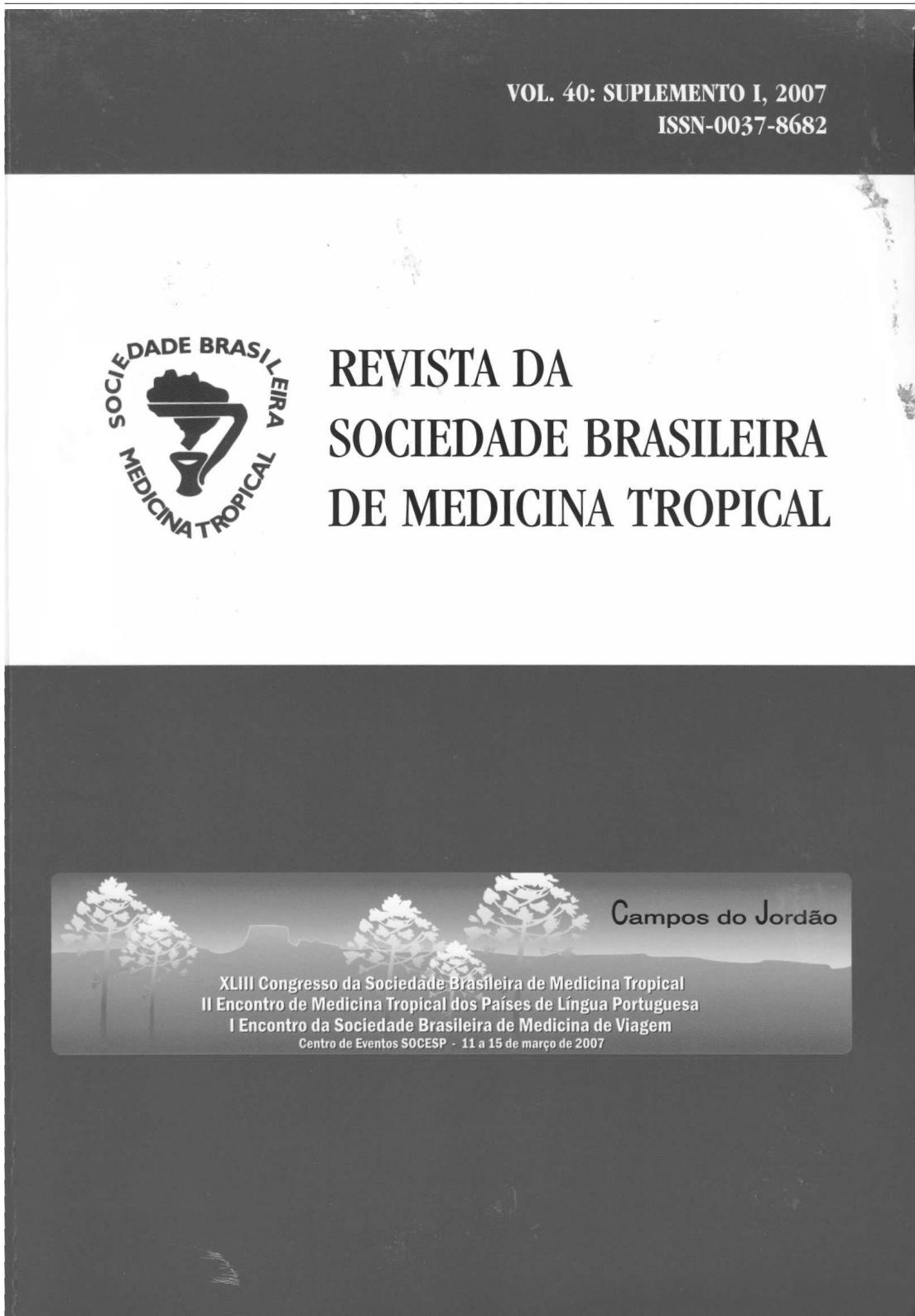
b: Basco et al. (1994)²⁰

c: Muriithi et al. (2002)²⁶

d: Randrianarivelojosia et al. (2003)²⁵



Anexo 3: Resumos apresentados em Congresso



MA054**ATIVIDADE ANTIPLASMÓDICA DE EXTRATO BRUTO, FRAÇÃO DE NEUTROS E SUBSTÂNCIA PURA OBTIDOS DE *ESENBECKIA FEBRIFUGA*.**

DOLABELA MF¹, OLIVEIRA, SG², PEREZ, J.M.²; NASCIMENTO, J.M.²; PÓVOA, MM² e OLIVEIRA, AB¹.

¹Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG

²Seção de Parasitologia, Instituto Evandro Chagas, Ananindeua, PA

Introdução: *Esenbeckia febrifuga* A. Juss (Rutaceae), conhecida como quina-do-mato, é utilizada popularmente como antimalárico e febrífugo. Em uma avaliação *in vivo*, o extrato aquoso de caule, na dose de 1,0 g/kg, mostrou-se parcialmente ativo em camundongos infectados com *Plasmodium berghei* (43% de inibição do crescimento) (Carvalho *et al.* 1991, Brazilian J Med Biol Res 24: 1113 - 1123) o que justifica o objetivo do presente trabalho. **Objetivo:** Avaliar a atividade antiplasmódica do extrato bruto, frações e constituintes micromoleculares de *E. febrifuga*, através *ensaios in vitro* em culturas de *Plasmodium falciparum* pelo microteste tradicional (vela/placa de Petri), utilizando-se a cloroquina como controle positivo e isolar substâncias ativas. **Material e Métodos:** O extrato etanólico de caule de *E. febrifuga*, a fração de neutros e a flindersiamina, obtidos por fracionamento do extrato bruto, foram avaliados utilizando-se a cepa W2 (cloroquina resistente) e diferentes concentrações das soluções teste (n=3). Para determinação da concentração inibitória 50% (IC_{50}) utilizou-se o probito. **Resultados.** O extrato bruto apresentou IC_{50} $15,5 \pm 0,71$ $\mu\text{g/mL}$ e IC_{90} $27,5 \pm 0,5$ $\mu\text{g/mL}$; para a fração de neutros obteve-se $IC_{50}=26,5 \pm 0,7$ $\mu\text{g/mL}$ e IC_{90} $47,5 \pm 9,1$ $\mu\text{g/mL}$ enquanto que somente a IC_{50} foi determinada para a flindersiamina (IC_{50} $83,0 \pm 4,6$ $\mu\text{g/mL}$). Para a cloroquina, droga controle, obteve-se IC_{50} $0,22\mu\text{g/mL}$.

Conclusão: As amostras testadas apresentaram atividade antiplasmódica menor que a cloroquina. O extrato bruto mostrou-se mais ativo do que a flindersiamina e, portanto, deve conter substâncias mais ativas do que este alcalóide furoquinilínico.

Apoio:CNPq

MA055

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPLASMÓDICA DE EXTRATOS DE *ASPIDOSPERMA RAMIFLORUM* Muell. Arg e *A.SPRUCEANUM* Benth ex. Müell. Arg.

DOLABELA MF¹, OLIVEIRA, SG², BRAGA, FC¹; PÓVOA, MM² e OLIVEIRA, AB¹.

¹Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG ²Seção de Parasitologia, Instituto Evandro Chagas, Ananindeua, PA

Objetivo: Estima-se que a ocorrência mundial de casos de malária, nos últimos anos, seja 300 - 500 milhões, dos quais 1 a 3 milhões evoluíram para óbito. O principal parasita causador desta doença, o *Plasmodium falciparum*, tem apresentado alto grau de resistência a drogas quimioterápicas usuais, o que torna de extrema importância a busca de novos fármacos antimaláricos. No contexto de uma pesquisa etnofarmacológica, selecionamos espécies do gênero *Aspidosperma* (família Apocynaceae), reconhecidas fontes de alcalóides indolomonoterpênicos, para uma triagem *in vitro* tendo sido avaliados, inicialmente, extratos de caules de *A. ramiflorum* (ARC) e *A.spruceanum* (ASC) e de cascas de *A.spruceanum* (ASCS). **Material e Métodos:** Cascas e caules foram secados e moídos, tratados com hidróxido de amônio e extraídos com dicloromentano, em aparelho de Soxhlet. Os extratos ARC, ASC e ASCS foram concentrados a resíduo e submetidos à prospecção fitoquímica por Cromatografia em Camada Delgada. A atividade antiplasmódica frente ao *P. falciparum* (cepa BHZ) foi avaliada pelo microteste tradicional (n=4). Para determinação da concentração inibitória 50% (IC_{50}) utilizou-se o probito. **Resultados:** Os perfis cromatográficos de ARC, ASC e ASCS revelaram a presença de saponinas, triterpenos e alcalóides; flavonoides foram observados apenas em ARC. Nos ensaios *in vitro*, as IC_{50} foram: ARC = $43,3 \pm 4,78 \mu\text{g/mL}$; ASC = $112,0 \pm 2,00 \mu\text{g/mL}$ e ASCS = $84,5 \pm 6,70 \mu\text{g/mL}$. Em todas as concentrações, observou-se, com ARC, redução significativa no percentual de esquizontes e aumento de trofozoítas. Todos os extratos apresentaram mostraram-se menos ativos que a cloroquina ($IC_{50}=0,09 \mu\text{g/mL}$). **Conclusão:** ARC foi o extrato mais ativo e pode conter substância(s) com atividade esquizonticida sanguínea.

Apoio: CNPq

Expert Opinion

1. Malaria as a world health problem
2. Antimalarials from plants and their use in combined therapies
3. The ethnopharmacological approach in searching for antimalarials
4. Models for antimalarial screening and for training expertise
5. Medicinal plants from Brazil are potential antimalarial sources
6. Medicinal plants used for malaria prophylaxis
7. Expert opinion

Antimalarial drug discovery: screening of Brazilian medicinal plants and purified compounds

Antoniana Ursine Krettli

*Instituto Rene Rachou – Fundação Instituto Oswaldo Cruz –FIOCRUZ, Malaria Laboratory,
Avenue Augusto de Lima 1715, Belo Horizonte, MG, CEP 30190-002, Brazil*

Background: Malaria is the most important parasitic disease and its control depends on specific chemotherapy, now complicated by *Plasmodium falciparum* that has become resistant to most commonly available antimalarials. Treatment of the disease requires quinine or drug combinations of artemisinin derivatives and other antimalarials. Further drug resistance is expected. New active compounds need to be discovered. **Objective/method:** To find new antimalarials from medicinal and randomly collected plants, crude extracts are screened against *P. falciparum* in cultures and in malaria animal models, following bioassays of purified fractions, and cytotoxicity tests. **Conclusion:** For antimalarial research, screening medicinal plants is more efficient than screening randomly chosen plants. Biomonitoring fractionation allows selection of new active molecules identified as potential antimalarials in multidisciplinary projects in Brazil; no new molecule is available for human testing. The advantages of projects based on ethnopharmacology are discussed.

Keywords: antimalarials, artemisinin derivatives, chloroquine resistance, drug discovery, drug resistance, malaria, medicinal plants, *Plasmodium falciparum*, quinine

Expert Opin. Drug Discov. (2009) 4(2):95-108

1. Malaria as a world health problem

Malaria remains the most important infectious disease in the world according to the World Health Organization (WHO), causing an unacceptable burden on health and on development [1]. Statistics show that > 2.4 billion individuals are exposed to the disease, > 500 million new cases are detected yearly with 1.7 million deaths, mostly children < 5 years of age in Africa. The number of clinical attacks due to *Plasmodium falciparum* seems to be at least 50% higher than WHO estimates [2]. Disease control is difficult because it mostly affects people living in poor areas of the world, such as sub-Saharan Africa, where infants, young children and pregnant women are most affected. In addition, there is a progressive spread of multidrug resistant strains of *P. falciparum* that, if not properly treated, cause severe malaria, coma and death, especially among children and adults experiencing their first contact with this disease.

In Brazil, ~ 500,000 malaria cases are diagnosed yearly, with 99% occurring in the Amazon region, where three of the four *Plasmodium* species exist. *Plasmodium vivax* is responsible for 80% of the cases; *P. falciparum* is the deadliest; and *Plasmodium malariae*, of rather low prevalence, is underdiagnosed through thick blood smears, the official method for routine diagnosis. Malaria transmission was controlled in the 1970s, with ~ 70,000 new cases diagnosed yearly, a number that has since increased significantly (Figure 1). Malaria control in the Amazon region is difficult owing to the dense forests, vast water collections, political issues

informa
healthcare

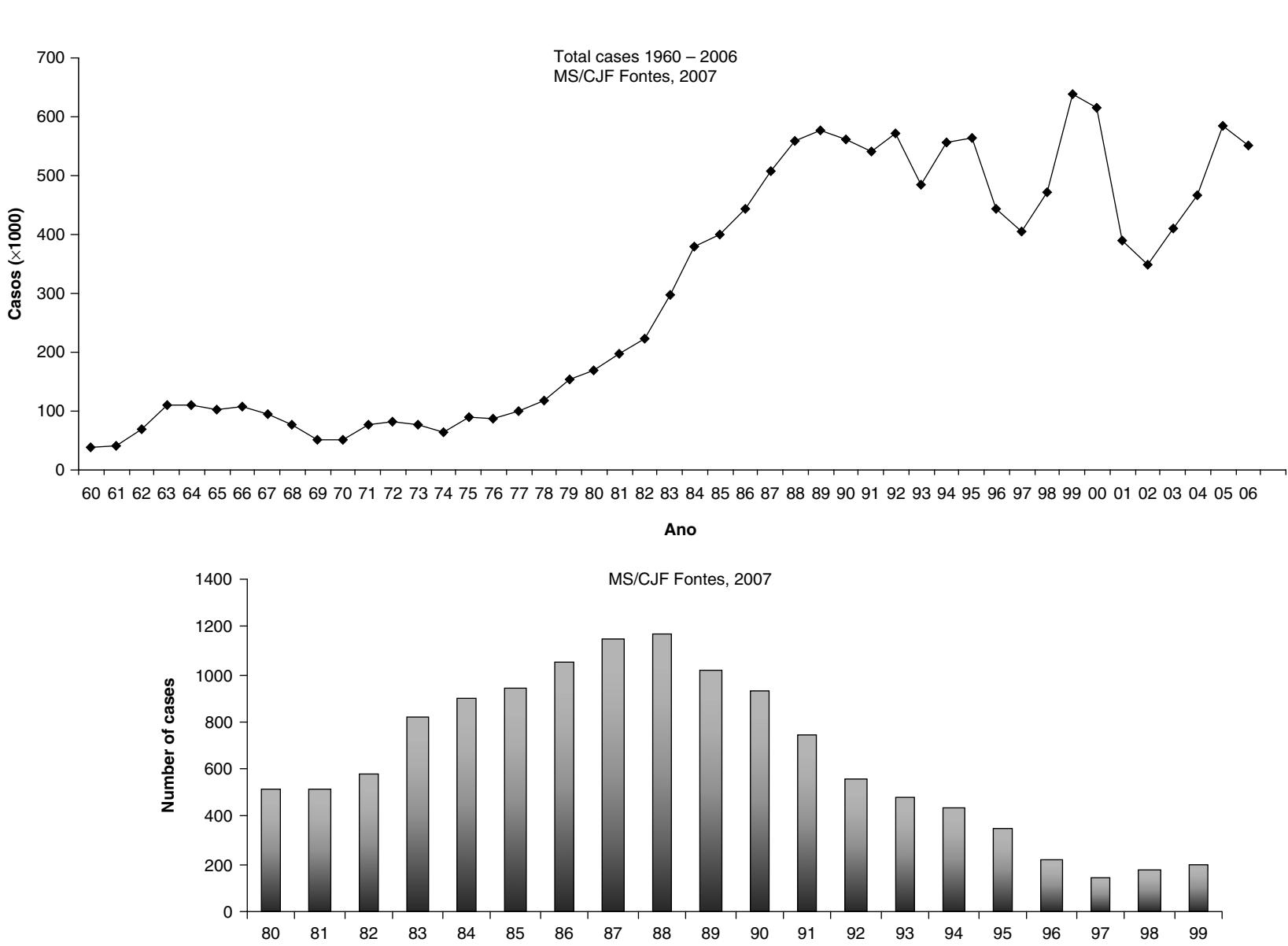


Figure 1. Historical series of malaria cases diagnosed and treated in Brazil. At present, 80% are caused by *Plasmodium vivax*.

and parasite resistance to chloroquine (CQ) and to other antimalarials, among other problems.

Most people affected by malaria have limited access to effective antimalarial therapies, making medicinal plants a common treatment for acute symptoms of the disease, especially fever. During the past decades, the malaria situation has worsened with the emergence and spread of *P. falciparum* resistance to antimalarials such as CQ, amodiaquine, sulfadoxine-pyrimethamine combinations and mefloquine (MQ) [3]. There is increasing evidence that *P. vivax* resistance to CQ also occurs and that this parasite may cause intense morbidity and mortality in some endemic countries [4-6] including Brazil [7]. This species is responsible for > 70% of malaria cases in Latin America [8].

Beginning in the 1940s, CQ, a synthetic antimalarial, has been used for decades all over the world for treatment of acute malaria. Active against the erythrocytic forms of all species, CQ is a very safe and inexpensive drug that is easy to administer (dosed orally in a 3-day schedule). It was also used for malaria prophylaxis in the past and was added to the cooking salt in Brazil, which seems to have given rise to a selection of *P. falciparum* resistant parasites. Chloroquine and the insecticide DDT (dichloro-diphenil-trichloroethane) inspired a global malaria control campaign that was launched in 1955, under the leadership of WHO, with the participation of governmental agencies worldwide. This campaign was abandoned in 1972 owing to the failure of CQ to cure *P. falciparum*, as reported first in South America (Colombia) and then in Southeast Asia (Vietnam) and in the Brazilian Amazon. Chloroquine resistance appeared years later in African endemic countries.

2. Antimalarials from plants and their use in combined therapies

Acute malaria symptoms, headache, high fever, chills and intense sweating, are caused by the intra-erythrocytic parasites. These symptoms require prompt treatment; otherwise death may occur within days in *P. falciparum* infection. Populations in rural areas of the 'Old World' were destroyed by malaria until the first remedy was discovered: infusions from the bark of Cinchona trees, native at high altitudes of the Peruvian Amazon. Taken to Spain in 1600 and popularly named 'Jesuit powder' or 'quinas', the plant was used to treat malaria in Europe from 1770 on, a decade before the malaria pathogen was described by Alphonse Laveran, who won a Nobel Prize for this discovery.

The alkaloid quinine was isolated in 1817 (by Pierre Pelletier and Joseph Caventou in France) from the barks of *Cinchona calisaya* and *Cinchona succirubra*. Quinine became the drug of choice for travelers, merchants and colonialists in African countries for centuries, until the plant supply was cut off during the Second World War. The first manufactured antimalarials, plasmoquine and mepacrine (atebrine), appeared as part of the war effort of the Allied

countries; > 16,000 compounds were tested by scientists in different continents and resochin was later recognized as the most potent antimalarial, and was renamed chloroquine [9]. The quinoline ring is the basic unit in the synthesis of CQ and other four aminoquinoline antimalarials that target the blood parasites (Figure 2).

Artemisia annua is a medicinal plant used in ancient medicine in China to treat hemorrhoids and fever. It was rediscovered by Chinese researchers as an important source of the antimalarial compound artemisinin [9] that was used since the 1980s to treat *P. falciparum* drug-resistant infections [10,11]. China and Vietnam are the chief producers of *A. annua*, but in recent years, other countries including Brazil [12] have increased its cultivation [13]. Artemisinin derivatives (AS) used with other antimalarials are recommended in the guidelines for malaria treatment as artemisinin-combined therapies (ACT) [14,15].

The principle behind ACT is that the drugs act synergistically or present different modes of action to prevent the evolution of drug resistance. Political and economic restrictions certainly interfere in the choice of drug combinations. The restrictions on the antimalarials available for human use and the ideal combinations should also consider cost-effectiveness [16]. The choice of the proper ACT also depends on the characteristics of the transmission area, intensity and type of drug resistance, political and economic restrictions and adequate evidence of the efficacy and safety of the available drug (Table 1). *In vitro* studies suggest resistance to AS [17]; if confirmed *in vivo*, this will make the situation worrisome because AS is the most efficient class of compounds adopted in ACT [18,19].

3. The ethnopharmacological approach in searching for antimalarials

It is estimated that ~ 250,000 species of plants are used in popular medicine in the world, but < 10% have been studied for their pharmacological activities [20]. In the case of malaria, the two most important antimalarials were isolated from plants: quinine from *Cinchona* sp., and artemisinin (quighaosu) from *A. annua*. The rediscovery of *A. annua*, from which Chinese scientists isolated artemisinin [10,11], has inspired the search for antimalarials in medicinal plants. Artemisinin and derivatives are used in ACT in areas with multidrug resistant parasites, whereas quinine is often reserved for the management of severe and complicated malaria [21].

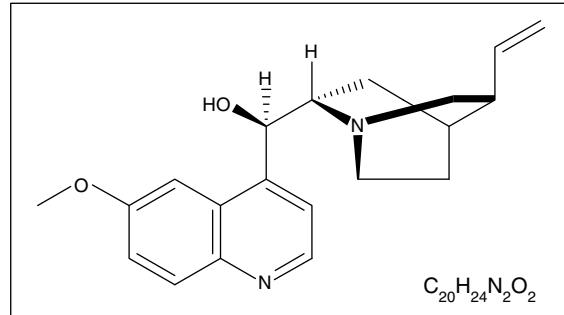
At the Malaria Laboratory, Institute Rene Rachou, FIOCRUZ, the choice of plants for antimalarial tests has been carried out using two approaches: i) random or empirical methods have been used for decades in continuing projects to explore the country's biodiversity; and ii) studies oriented by traditional medicine to select plants used to treat fever and/or malaria [22]. It is not surprising that among > 300 plant species randomly chosen, only 3 were active against

Antimalarial drug discovery: screening of Brazilian medicinal plants and purified compounds

(i) Quinine  From *Cinchona calisaya* and *C. succirubra*, two Peruvian plants brought to Europe early 1600

The quinolinic ring, the basis of the synthetic compounds:

- Chloroquine
- Amodiaquine
- Mefloquine
- Primaquine



(ii) Artemisinin  From *Artemisia annua*, a medicinal plant of milenium use in China

The active sesquiterpene lactone contains a trioxane ring system, the endoperoxide bond; its more soluble derivatives are:

- Artesunate
- Artemether
- Arteether

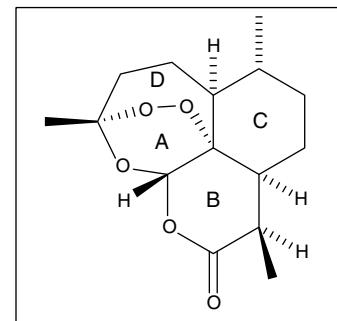


Figure 2. Antimalarials isolated from medicinal plants (quinine and artemisinin).

Table 1. Antimalarials against *Plasmodium falciparum* used in combined therapies and limitations of their use.

Antimalarials	Limitations in human use	Combined therapy with	Adopted in
Amodiaquine	Resistance, toxicity	Artesunate	Africa
Artesunate	Resistance, cost, noncompliance	Amodiaquine, combined sulfadoxine and pyrimethamine treatment, mefloquine	Africa, Asia, South America
Artemether	Resistance, cost, noncompliance	Lumefantrine	Africa, Asia, South America
Atavaquone	Resistance, cost	Proguanil	Asia
Chloroquine	Resistance	Artemether	South America
Halofantrine	Resistance, cost, bioavailability, toxicity	–	Africa, South America
Lumefantrine	Resistance, cost, noncompliance	Artemether	Africa, Asia, South America
Mefloquine	Resistance, cost, toxicity	Artesunate	Asia, South America
Pyrimethamine	Resistance	Artesunate	Africa, South America
Quinine	Long treatment schemes	Doxycycline and other antibiotics	South America
Sulfadoxine	Resistance	Artesunate	Africa, Asia, South America

Data adapted from WHO (2006) and expanded.

malaria, whereas 50% of extracts from medicinal plants were active, reducing parasitemia and mortality in mice with *Plasmodium berghei*, and/or inhibiting the growth of *P. falciparum* in blood cultures [23-25]. The success rate for finding active compounds dramatically increases when plants are selected using the ethnopharmacological approach. One species, *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke, 'Indian beer', is believed to act as a malaria prophylactic and is extensively used in endemic areas [26]. The plant extracts are inactive against the blood-induced malaria infections in animals [27], but hamper sporozoite development [28], which will be discussed later.

The search for new antimalarials from plants has intensified in the past decades and several multidisciplinary teams involving biologists, chemists, botanists, economists and pharmacologists are trying to develop new products using the ethnopharmacological approach [23,29]. It is not clear why so few antimalarials have been developed from the traditional remedies used in developing countries [30]. One exception is a novel lead compound that was obtained from a medicinal remedy used in Madagascar to prevent malaria. This compound is a plant-derived alkaloid that is active against liver stages of malaria, as discussed in the section titled 'Medicinal plants used for malaria prophylaxis'.

4. Models for antimalarial screening and for training expertise

Before the *P. falciparum* blood cultures were established [31], the avian model was used to test new antimalarials, which was later replaced by tests with rodent malaria [32]. The *P. berghei* model in mice is most useful for antimalarial screening *in vivo* [22-24,33,34]. The reasons for its usefulness are: i) mice are small and easy to handle compared to rats, chicks or monkeys; ii) the parasites, not infective to humans, are highly virulent to mice, killing them in < 2 weeks; iii) blood parasites are easy to maintain in liquid nitrogen, deep freezers or in young rats that develop a chronic self-limiting disease and; iv) drug-resistant parasites are easy to select by drug pressure [35-37], and are useful in testing the antimalarial therapeutic activity of new compounds [38]. Therefore, this model is ideal for training students in malaria work, a program started several decades ago, when our group tested > 200 synthetic molecules in mice. This allowed for the identification of new antimalarial compounds such as sulfonamides, dihydroquinine and dihydroquinidine derivatives [38-40]. The availability of *P. berghei* that express green fluorescent protein (GFP) [41] makes the *in vivo* tests less tedious, faster and more precise compared to traditional microscopic evaluations.

The *P. falciparum* quantitative culture of blood parasites *in vitro* [42] is still the ideal method for screening the antimalarial activity of synthetic molecules and plant extracts [43-45] because it requires small amounts of the compounds and is

fast and reproducible. Several techniques are available for evaluating the drug inhibitory concentration (IC) of parasite growth, which is important for comparison with the standard antimalarials. Microscopic examinations of blood smears, radioisotope incorporation (tritiated hypoxanthine) by the parasites, colorimetric or fluorescence immunoassays and *P. falciparum* GFP are chosen according to the laboratory facilities available [46-50]. Mass screening of other groups of synthetic molecules (CQ analogues, and protease inhibitors) has allowed identification of new and promising antimalarial compounds that need to be further evaluated in animal models [51,52].

A new hybrid salt, the artesunate of mefloquine (MEFAS), experimentally tested against human and rodent malaria, proved to be more active, less expensive and less toxic than the equivalent concentration of MQ/AS [53]. This new salt is a rather promising compound, requiring further pharmacological studies before it is used against human malaria. To this day, CQ remains the gold standard for new antimalarial discovery and development; it is a safe and inexpensive drug (< US\$ 0.20 for an adult's 3-day treatment) with little, if any, side effect even in lifelong treatments as are those for autoimmune diseases.

5. Medicinal plants from Brazil are potential antimalarial sources

Brazil has one of the richest biodiversities in the world, especially in the Amazon area, a region where malaria is still endemic and represents an important problem. About 20 years ago, a survey was performed by researchers studying the economic impact of malaria, in which the use of medicinal plants as a source of antimalarials was evaluated by interviewing inhabitants of the Amazon, most of them migrants from malaria-free areas; some community leaders, healers and local indigenous inhabitants, who all had lifelong exposure to malaria, were also interviewed [22,54]. Several plant species known to treat fever, liver disorders and/or malaria in Brazil were identified. With the help of the informants, samples were collected at the site of the interview and then properly stored for further reference and botanical classification. Extract preparations performed by phytochemists at the laboratory use different parts of the fresh samples, with solvents chosen according to the plant's popular use.

Once received for the pharmacological bioassays, the extracts are stored in a refrigerator, and tested as soon as possible. Extracts that inhibit ≥ 50% of *P. falciparum* growth *in vitro* are used in further quantitative tests *in vitro*. The most active are selected for *in vivo* tests against rodent malaria following fractionation by chromatography to identify the component responsible for the activity. Tests of cytotoxicity *in vitro* allow determination of the compound specificity; extract cytotoxicity may be tested before the antimalarial tests and the less toxic compounds evaluated.

Table 2. Antimalarial activity of Brazilian plants extracts against *Plasmodium falciparum* (*Pf*) in blood cultures ($\geq 10 \mu\text{g/ml}$) or *Plasmodium berghei* (*Pb*) in mice (treated with $\leq 1 \text{ g/kg}$) measured as percentage inhibition of parasite growth in relation to untreated controls.

Family	Species	Selection	<i>Pf</i> (%)	<i>Pb</i> (%)	Ref.
Asteraceae (Compositae)	<i>Acanthospermum australe</i>	Rational	63	40	[34]
	<i>Alomia myriadenia</i>	Empirical	90	43	[34]
	<i>Bidens bipinnatus</i>	Rational	71	40	[25]
	<i>Bidens pilosa</i>	Rational	90	55	[25]
	<i>Eupatorium squalidum</i>	Empirical	0	48	[34]
	<i>Sympyopappus</i> sp.	Rational	80	45	UD
	<i>Vernonia brasiliiana</i>	Empirical	71	41	[34]
Apocynaceae	<i>Thrix vauthieri</i>	Rational	83	NT	UD
	<i>Peschiera australis</i>	Rational	94	NT	UD
	<i>Aspidosperma nitidum</i> *	Rational	98	70	UD
Aristolochiaceae	<i>Aspidosperma</i> sp.	Rational	80	NT	UD
	<i>Holostylis reniformis</i>	Rational	98	60	[45]
Cecropiaceae	<i>Cecropia glaziovii</i>	Rational	84	34	UD
	<i>Cecropia pachystachya</i>	Rational	80	42	UD
Gentianaceae	<i>Lisanthus speciosus</i>	Rational	0	38	[34]
	<i>Tachia guianensis</i>	Rational	0	39	[34]
Leguminosae	<i>Deguelia longeracemosa</i>	Rational	92	40	UD [§]
	<i>Lonchocarpus montanus</i>	Rational	85	NT	UD [§]
Loganiaceae	<i>Strichnus pseudoquina</i>	Rational	NT	56	UD
Olacaceae	<i>Ximenia americana</i>	Rational	62	40	UD
Rhamnaceae	<i>Ampelozizyphus amazonicus</i>	Rational	0	0 [†]	[22,23]
Rubiaceae	<i>Remijia ferruginea</i>	Rational	78	48	[58]
Rutaceae	<i>Esenbeckia febrifuga</i>	Rational	NT	43	[34]

*The extract and fractions tested prepared by Maria Meneses Pereira [56] and are under studies.

[†]The extracts inhibit sporozoite development *in vivo* and *in vitro* [28].

[§]Fractions prepared by the group of W. Vilegas, University of Campinas (SP).

NT: Not tested; UD: Unpublished data.

5.1 The plant species and active compounds characterized

Among 60 species of Brazilian plants experimentally tested, 28 are active against *P. falciparum* *in vitro* and/or against *P. berghei* in mice (Table 2). Plants are from the following families: Asteraceae (*Alomia myriadenia*, *Acanthospermum* sp., *Bidens pilosa*, *Eupatorium* sp., *Sympyopappus* sp., *Thrix vauthieri*, *Vernonia brasiliiana*) [54-56]; Apocynaceae (*Peschiera australis*, *Aspidosperma nitidum*) [34,57]; Aristolochiaceae (*Holostylis reniformis*) [45]; Cecropiaceae (*Cecropia glaziovii*, *Cecropia pachystachya*); Gentianaceae (*Lisanthus speciosus*, *Tachia guianensis*); Leguminosae (*Deguelia longeracemosa*, *Lonchocarpus montanus*); Loganiaceae (*Strichnus pseudoquina*); Olacaceae (*Ximenia americana*); Rubiaceae (*Remijia ferruginea*) [58]; and Rutaceae (*Esenbeckia febrifuga*) [34]. The compounds identified as responsible for antimalarial activity

are: i) flavonoids and polyacetylenes from *Bidens* sp. [55]; ii) flavonoids, escandenin [A1] and robustic acid from *Deguelia*; iii) lignans from *H. reniformis* [45]; iv) a lactone from *Sympyopappus* sp. and; v) triterpenes (lupeol) in hexane extracts from *V. brasiliiana* that have *in vitro* activity against *P. falciparum* but are inactive in mice [56] and; vi) alkaloids from *A. nitidum* [57] and *S. pseudoquina*.

Not all traditional remedies selected for the antimalarial tests inhibit growth of the blood parasites, including some Cinchona-like plants used as remedies in Latin America; they all have a bitter taste being used as tonics, and indicated for fever and malaria. Of the 26 ethanolic extracts (provided by Dr Maria GL Brandão, UFMG) tested against *P. falciparum* *in vitro* and *P. berghei* in mice, 18 were inactive and 6 were partially active *in vitro*. Extracts of *R. ferruginea* (quina-do-mato) were active in both tests [58];

Table 3. Hexane extracts from different parts of *Holostylis reniformis* tested in mice infected with *Plasmodium berghei* erythrocytic forms.

Origin of the plant extract for treatment	Inhibition of parasite growth (%)	Survival at various days after malaria infection (%)		
		9th	14th	20th
Leaves	48	80	20	0
Stems	25	80	20	0
Roots	67	100	60	20
Water*	0	80	40	0

*Control non-treated group (n = 5).

Plant extracts provided by Lúcia MX Lopes, UNESP (State University of São Paulo, Araraquara SP, Brazil) [45].

extracts of *S. pseudoquina* (provided by Dr W Vilegas, UNESP) and of *E. febrifuga* tested only against rodent malaria were active *in vivo*. Other Cinchona-like plants tested and found inactive *in vivo* were *Geissospermum* sp. (Apocynaceae), named quina, and *Coutaria hexandra* (Rubiaceae), named quina-quina [34].

Several phytochemistry collaborators performed the chemical portion of the work. All are involved in training undergraduate and graduate students at universities in Brazil and at FIOCRUZ, allowing multidisciplinary projects on malaria to be effective, in spite of the logistical problems that occur when students are involved, (further discussed in the Expert opinion section). The collaborators are cited in the references, or listed in the acknowledgments and/or at [59].

5.1.1 *Bidens pilosa*

Several species of *Bidens* (Asteraceae) are used in different parts of the world as remedies against fever and/or liver diseases. We experimentally tested nine species and found seven that are active *in vitro* [25]. We focused on *B. pilosa*, a wild herbal plant that is commonly used in Brazil and is found everywhere in the country. It is used extensively, even on newborns. One assumes that it has low toxicity.

The crude extracts of the leaves, roots and the whole plant showed strong activity against rodent malaria. Extracts and fractions stored at low temperatures soon became inactive. The flavonoids and polyacetylenes responsible for such activity oxidize shortly after isolation, even when kept at low temperatures [55]. Attempts to stabilize the purified fractions have failed. Another problem is that, although the wild plants are very active, extracts from cultivated specimens grown in diverse types of soil are less active when evaluated in parallel tests [44]. This makes development of a new antimalarial from *Bidens* sp. complicated, whereas its use as a phytotherapeutic agent may now be validated as antimalarial.

5.1.2 *Holostylis reniformis*

Like *B. pilosa*, this is also a medicinal plant that grows in the wild and is collected in the State of Minas Gerais. The

hexane extract of *H. reniformis* roots showed strong activity against *P. berghei* in mice, causing 67% reduction of parasitemia (Table 3 and Figure 3). Six lignans isolated from the plant extract (by Lopes *et al.*) were tested *in vitro* and three proved to be active against the erythrocytic forms of *P. falciparum*, strain BH2 26/86 (a partly CQ-resistant strain *in vitro* that was isolated from a Brazilian malaria patient) [44]. The most active lignan ($IC_{50} \sim 0.20 \mu M$) (Table 4) has dimethoxy substituents on the A ring and on the B ring in a *trans-trans* orientation (Figure 4). Lignoids with different structural types isolated from other Aristolochiaceae species possess a wide range of biological activities. They are used as lead compounds for the development of new drugs with antiangiogenic, antiviral, antileishmanial, antifungal, hypolipidemic, antirheumatic and antimalarial activities [60,61].

6. Medicinal plants used for malaria prophylaxis

Most standard antimalarials and medicinal plants are used to treat malaria symptoms, especially fever; however, two plants are used as remedies to prevent malaria: *Strychnopsis thouarsii* (Menispermaceae) is used in Madagascar [62] and *A. amazonicus* (Rhamnaceae) is used in Brazil [22,27]. The latter species, known as Indian beer or 'Saracura Mira', is popularly used daily in cold infusions from the plant roots, a foamy drink with bitter taste, thus its popular name. The pulverized plant roots used for chemical characterization showed that 10% are saponins [63]. Crude fresh plant extracts and saponin-enriched fractions are totally inactive against the blood malaria parasites, in both rodent and avian malaria models, and in cultures of human malaria parasites. Likewise, 46 purified plant fractions freshly prepared (by Jefferson Rocha, UFAM) and tested *in vitro* were also inactive against *P. falciparum* parasites *in vitro*, and in *P. berghei* infected mice (unpublished data).

A prophylactic activity of *A. amazonicus* against sporozoite-induced malaria is reported in chicks pretreated with daily doses of the plant extract given before inoculation with *Plasmodium gallinaceum* sporozoites. Treatment resulted in

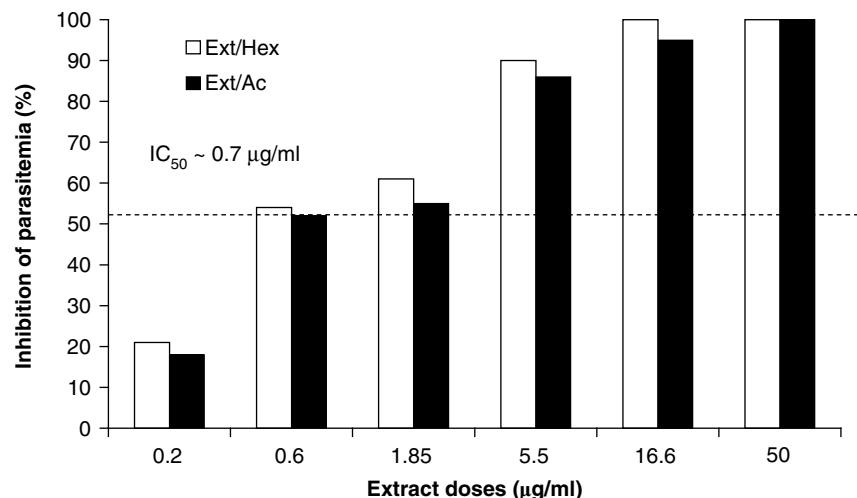


Figure 3. Antimalarial activity of hexanic (Ext/HEX) and acetone extracts (Ext/AC) from *Holostylis reniformis* tested *in vitro* against chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum*.

Chloroquine tested in parallel: $IC_{50} = 0.09 \mu\text{g}/\text{ml}$.

Table 4. Anti-plasmoidal activity of natural aryltetralone lignans, isolated from *Holostylis reniformis* roots, tested against the erythrocytic forms of *Plasmodium falciparum*, strain BHZ 26/86, which is partly chloroquine-resistant.

Compounds	IC_{50} (mM)*	IC_{90} (mM)*	Activity
Lignan 1	0.26	3.35	Active
Lignan 2	0.32	4.60	Active
Lignan 3	0.20	3.00	Active
Lignan 4	0.63	2.61	Partially active
Lignan 5	8.00	19.70	Inactive
Lignan 6	> 140.00	> 140.00	Inactive
Chloroquine	0.19	0.70	Active

*Inhibitory concentration doses of 50% (IC_{50}) or 90% (IC_{90}) parasite growth measured by incorporation of radioactive hypoxanthine in cultured parasites.

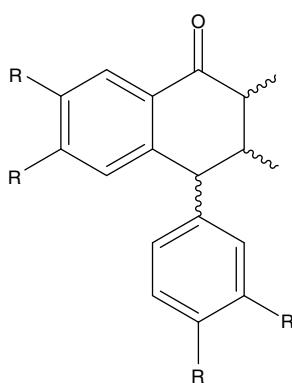


Figure 4. Lignans of *Holostylis reniformis*, new prototypes of antimalarials.

Patent PI0404986-1, Rev Prop Ind 2004;1774.

an extended malaria pre-patent period and a smaller number of exoerythrocytic forms (EEFs), much like the sulfadiazine-treated group (Table 5 and Figure 5) [23]. The activity was confirmed in rodent malaria: Indian beer extracts hampered sporozoite development of *P. berghei* in HepG2 cells in cultures and the remaining EEFs were significantly smaller [28]. Administration of the extract to mice before the *P. berghei* sporozoite inoculation by mosquito bites was effective against malaria, because some animals never became infected. Among the infected ones, the malaria pre-patent period was significantly delayed, followed by a lower parasitemia. Mortality was also reduced, and by the second week of infection, all the non-treated infected controls had died.

The Indian beer crude extract was unable to inhibit *P. gallinaceum* sporogony in *Aedes vexans* mosquitoes [64], an alternative experimental host for avian malaria [65]. Mosquitoes blood-fed on infected chickens previously treated with the Indian beer extracts showed the same number of oocysts (Tables 5 and 6). Tested in parallel, primaquine completely blocked oocyst production, as shown previously [66]. Therefore, the Indian beer activity is not expected to inhibit hypnozoites, which are late liver stages developing from sporozoites and are responsible for late *P. vivax* malaria relapses that are treated with primaquine in Brazil [8].

To identify the molecule responsible for the prophylactic activity of Indian beer and clarify its mechanism of drug action, further work is needed with sporozoites. In Brazil, only sporozoites of *P. gallinaceum* are available for laboratory studies, but the avian malaria model is complex (Table 6). First, chicks grow fast, becoming large animals in 2 – 3 weeks and require enormous amounts of purified compounds for the *in vivo* tests. Second, the EEFs in avian malaria develop in various types of cells including macrophages and in endothelial cells. Exoerythrocytic forms

Table 5. Activity of *Ampelozizyphus amazonicus* ethanolic extract against *Plasmodium gallinaceum* measured for its ability to inhibit the development of exoerythrocytic forms (EEFs) in chicks infected with sporozoites after treatment; unlike primaquine, the extract was unable to inhibit parasite sporogony in *Aedes fluviatilis* mosquitoes fed on malaria-infected chicks, before or after drug treatment.

Malaria-infected chickens treated or untreated (controls) (n = 5)	Mean of brain capillaries with EEF (% reduction in relation to untreated controls)	Mean of oocysts per midgut (% reduction in relation to mosquitoes fed on chickens before drug treatment) [‡]
Controls	30 (0)	123 (0)
Indian beer	10 (67)	61 (0)
Sulfadiazine*	1 (97)	ND
Primaquine*	ND	0 (100)

*Sulfadiazine and primaquine used as control antimalarials, in parallel with the plant extract.

[‡]'Indian beer' fraction AZA-D. The average number of oocysts was 30 in the control mosquitoes fed before chicken extract treatment. Indian beer did not inhibit malaria sporogony. Primaquine totally inhibited sporogony, i.e., whereas the mosquitoes blood-fed on untreated chicks had 86 oocysts, those blood-fed on primaquine-treated chicks showed no oocysts.

Data adapted from [23,63].

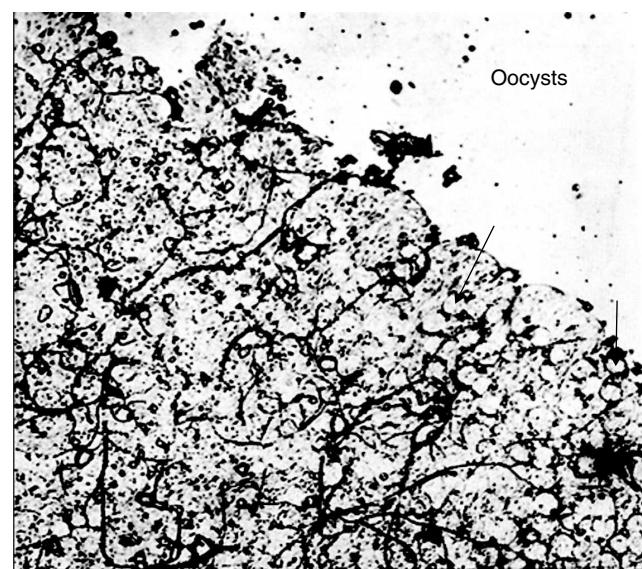
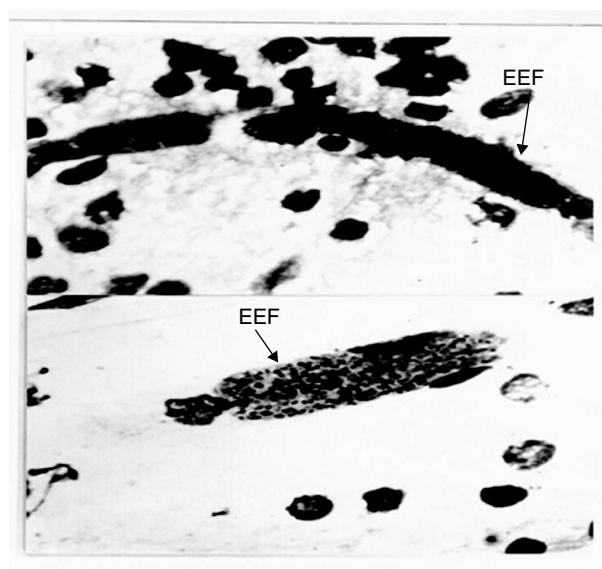


Figure 5. *Plasmodium gallinaceum* exoerythrocytic forms (EEF) in the brain endothelial cells of chickens inoculated with the parasite sporozoites (left panel) and oocysts (arrows) in the midguts of mosquitoes *Aedes fluviatilis* (right panel). These are models to test compounds with prophylactic activity ('Indian beer') and drugs able to cure the late relapses caused by *Plasmodium vivax* (drugs like primaquine), respectively.

emerge from sporozoites, from blood stages and from other EEFs, making *in vivo* tests difficult and unsuitable for studies of antimalarial chemotherapy.

There are no mosquito species susceptible to *P. berghei* for sporozoite production available in Brazil. The *Anopheles* mosquitoes (*An. stephensi*, *An. gambiae*), raised mostly in laboratories abroad for this rodent malaria model, are not present in Latin America, where they should not be introduced because they are potential vectors for human malaria [67]. To further characterize the Indian beer activity

against rodent malaria, the crude plant extracts had to be taken to Europe and tested against *P. berghei* sporozoites. Recent results using this mice model at Lisbon University (IHMT, CMED) confirmed the plant activity [28] as previously demonstrated in avian malaria [23], and validated the popular use of Indian beer as a prophylactic against the disease. Further studies are critical before the human use of Indian beer extracts can be recommended.

Few laboratories in the world produce the *P. falciparum* sporozoites needed for bioassay-guided fractionation of plant

Table 6. Activity of *Ampelozizyphus amazonicus* ethanolic extracts against *Plasmodium gallinaceum* measured for its ability to inhibit either the development of exoerythrocytic forms (EEFs) in chicks infected with sporozoites, or parasite sporogony in *Aedes fluviatilis* mosquitoes fed on malaria-infected chicks, before or after drug treatment. Different antimalarials are used as control.

Drug concentrations ($\mu\text{g/ml}$)	Average number of schizonts in cell cultures \pm SD	Parasitized cells <i>in vitro</i> (% growth)	Malaria PPP in days (Average \pm SD)	Mice infected/total inoculated*
400	ND	ND	16 \pm 1.4	2/4
200	ND	ND	12 \pm 1.4	3/4
100	20 \pm 2	10	7.7 \pm 1.4	4/4
50	59 \pm 4.2	30	ND	ND
10	148 \pm 12.5	80	ND	ND
5	186 \pm 8.7	100	ND	ND
0 [‡]	188 \pm 10.4	100	6 \pm 0.9	4/4

*Results from one representative experiment.

Data adapted from [26,63].

ND: Not done; PPP: Pre-patent period; SD: Standard deviation.

extracts aimed at prophylaxis like that performed with *Strychnopsis thouarsii*, a medicinal plant traditionally used in Madagascar to prevent malaria. A novel active anti-sporozoite compound, a morphinan alkaloid named tazopsine, that fully inhibits the development of *P. falciparum* sporozoites *in vitro*, and of *Plasmodium yoelii* *in vivo* and *in vitro* and is inactive against the erythrocytic parasites was isolated [62].

7. Expert opinion

The control of human malaria is based on treatment with antimalarials that is now complicated owing to the selection and worldwide spread of CQ-resistant *P. falciparum* parasites. The two most important antimalarials used at present are isolated from old medicinal plants: quinine from *Cinchona* sp., and artemisinin (quighaosu) from *A. annua*. There is a possibility of the development of parasite resistance to AS and, hence, new alternative antimalarials are needed. Multidisciplinary programs based on the search for antimalarials from medicinal plants remain an important alternative to be further explored, especially in Brazil. In the country, the richest plant biodiversity is present in the Amazon region, where malaria is endemic and the use of medicinal plants against fever and/or malaria is common.

The parasite blood stages in animal models and *in vitro* parasite cultures are used to evaluate the antimalarial activity of new compounds. The *P. falciparum* blood cultures remain as ideal method for mass screening the antimalarial activity of synthetic molecules and plant extracts. To evaluate the minimal drug concentration needed for parasite growth, methods are chosen according to the laboratory facilities: microscopy, radioisotope incorporation (tritiated hypoxanthine), colorimetric or fluorescence immunoassays and transfected

fluorescent parasites. The screening of plant extracts has allowed identification of compounds in 50% of the medicinal plants with antimalarial activity, although not all the traditional remedies used inhibit parasite growth. Among several Cinchona-like plants tested, only *E. febrifuga*, *R. ferruginea* and *S. pseudoquina* were active. These remedies have in common a bitter taste, usually a consequence of the presence of alkaloids, and they are used as tonics and for other indications.

Plants used as prophylactics may be inactive against the blood parasites but may affect sporozoite development, as in the case of *S. thouarsii* (Menispermaceae), used in Madagascar, and *A. amazonicus* (Rhamnaceae), known as Indian beer or Saracura Mira in Brazil, where it is used. A novel morphinan alkaloid (tazopsine) isolated from the former, fully inhibits development of *P. falciparum* sporozoites *in vitro*, and of *P. yoelii* *in vivo* and *in vitro*, thus representing a potent new antimalarial lead. Further studies on Indian beer are essential to isolate the active anti-sporozoite compound.

Although several new compounds with antimalarial activity against *P. falciparum* in cultures and/or in rodent malaria have been characterized in Brazilian plants, none has become a product ready to be tested in humans. The main problems hampering such development are: i) the low stability of the purified compounds, as shown in *B. pilosa* (Asteraceae), where flavonoids and polyacetylenes responsible for the activity oxidize shortly after isolation; ii) the small amount of the active component in the plant extract, which results in insufficient amounts after purification for the *in vivo* tests that are essential to confirm drug activity against the disease, as is the case for *Aspidosperma* sp. alkaloids; iii) the toxicity of the active compound is not specific to the malaria

parasites; iv) the low solubility of most crude extracts and/or their high toxicity against other mammalian cells *in vitro*; v) the large amounts of active compounds needed to evaluate toxicity *in vivo* and drug pharmacokinetics is not often easy to produce; vi) the place for plant collection, as observed with some Cinchona-like plants, and time of plant collection, as in *B. pilosa* and; vii) time of the year the plant is harvested and type of soil used for plant growth, among others.

The skills required to find an active molecule on screening and to develop a new product are rather different. The latter requires collaboration with the pharmaceutical industry and strong financial support. In Brazil, most leading scientists involved in multidisciplinary projects with plant-derived compounds aiming at new biologically active compounds are driven to academia rather than to technology, working at public universities and/or at FIOCRUZ. No doubt, an important contribution from such work is the result of the effective training of scientific personnel, technicians and students, from undergraduates to postdoctoral fellows, attracted to malaria research and medicinal plants. However, the fact that students are involved causes further limitations since they must publish results as a requirement for obtaining their degrees, and often work under pressure of tight schedules to warrant fellowships and further financial support.

The constrained success in the creation of a new medicine may reflect other limitations. First, human clinical trials are rather expensive and require a type of expertise and group coordination that most basic researchers do not have. Second, *P. falciparum* malaria receives special attention in all attempts to find new antimalarial drugs. It is a deadly parasite and the only species cultivated continuously *in vitro*, but its prevalence in Latin America is < 20%, making clinical trials harder. No patent protection is allowed for natural products in Brazil, a further disadvantage that other countries do not face; only chemically characterized compounds can be patented in Brazil [68].

A novel anti-sporozoite compound isolated from a medicinal plant, a morphinan alkaloid named tazopsine, that fully inhibits the development of *P. falciparum* sporozoites is a masterpiece of ethnopharmacology work published in *Plos Medicine*. As the editor writes: "The researchers wanted to take the traditional herbal remedy – of *S. thouarsii* bark

boiled in water – and find out precisely which molecule in that remedy was responsible for the antimalarial activity. After many rounds of separation and testing, the researchers got down to a single, apparently new, molecule that was active against malaria in the laboratory test, and this molecule was named tazopsine (in the Malagasy language the word Tazo refers to malaria)".

Unfortunately, projects undertaken with *S. thouarsii* at present can not be undertaken in Brazil due to a lack of laboratory-raised Anopheles mosquitoes susceptible to rodent or human malaria parasites. This has limited the studies on Brazilian plants with prophylactic activities aiming sporozoite development, like that shown in *A. amazonicus* [28]. In order to conclude this investigation started decades ago, we had to rely on collaborations abroad. This technical limitation needs to be overcome with the help of entomologists, so that the Brazilian diverse flora would be better investigated.

Acknowledgments

The author thanks the collaborators at the Malaria Laboratory in the Institute René Rachou, FIOCRUZ: LH Carvalho, AA Andrade (now at FMTM), VF Andrade Neto (now at UFRN), my present students F de Pilla Varotti, RC Paula, LG Krettli and IO Freitas, and many generations of past students involved in the chemotherapy project. I also thank the phytochemists and their groups, C Zani (FIOCRUZ-BH), D Santos-Filho and J Callegary (USP-RP), LM Xavier Lopes (UNESP), M das Graças Lins Brandão (Faculty of Pharmacy, UFMG), MF Goulart and ES Goulart (Institute of Chemistry, IQ, UFAL), M de Menezes Pereira and J Rocha (UFAM), P Magalhães and E Magalhães (IQ-UNICAMP), G Scharwstman and M Benetti (UFRGS), for collaboration through the years; the chemists, MV Nora Souza, N Boechat, W Cunico (Farmanguinhos-FIOCRUZ-RJ), P Imamura (IQ-UNICAMP), for providing new synthetic compounds and/or standard antimalarials; J Adebayo and Aline U Krettli for English language corrections; and CNPq, FIOCRUZ, FAPEMIG for financial support and fellowships.

Declaration of interest

The research was supported by CNPQ, FAPEMIG and PDTIS_MS FIOCRUZ.

Bibliography

1. Malaria facts (WHO Media Centre). World Health Organization, 2007. Available from: www.who.int/entity/mediacentre/factsheets/fs094/en [Last accessed 29 July 2008]
2. Snow RW, Guerra CA, Noor AM, et al. The global distribution of clinical episodes of Plasmodium falciparum malaria. *Nature* 2005;434:214-17
3. Ridley RG. Medical need, scientific opportunity and the drive for antimalarial drugs. *Nature* 2002;415:686-93
4. Baird JK. Chloroquine resistance in Plasmodium vivax. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:4075-83
5. Marfurt J, Mueller I, Sie A, et al. Low efficacy of amodiaquine or chloroquine plus sulfadoxine-pyrimethamine against Plasmodium falciparum and P. vivax malaria in Papua New Guinea. *Am J Trop Med Hyg* 2007;77:947-54
6. Genton B, D'Acremont V, Rare L, et al. Plasmodium vivax and mixed infections are associated with severe malaria in children. *PLoS Med* 2008. Published online 17 June 2008, doi:10.1371/journal.pmed.0050127
7. Santos-Ciminera PD, Roberts DR, Alecrim MG, et al. Malaria diagnosis and hospitalization trends, Brazil. *Emerg Infect Dis* 2007;13:1597-00
8. Brazilian Health Ministry. Available from: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/folder_malaria_2008_final.pdf [Last checked August 1s, 2008]
9. Meshnick SR, Dobson M. The history of antimalarial drugs. In Antimalarial Chemotherapy. Mechanisms of Action, Resistance, and New Directions in Drug Discovery. In: Rosenthal PL, editor, Human Press Inc. New Jersey, USA; 2001. p. 15-25
10. Bruce-Chwatt LJ. Qinghaosu: a new antimalarial. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1982;284(6318):767-68
11. Klayman DL. Qinghaosu (artemisinin): an antimalarial drug from China. *Science* 1985;228:1049-55
12. Ferreira JFS, Lauglin JC, Delabays N, Magalhaes PM. Cultivation and genetics of Artemisia annua L. for increased production of antimalarial artemisinin. *Plant Genet Resour* 2005;3(2):206-29
13. Delabays N, Simonnet X, Gaudin M. The Genetics of Artemisinin Content in Artemisia annua L. and the Breeding of High Yielding Cultivars. *Curr Med Chem* 2001;8:1795-01
14. Kremsner PG, Krishna S. Antimalarial combinations. *Lancet* 2004;364:285-94
15. White NJ, Olliaro PL. Strategies for the prevention of antimalarial drug resistance: rationale for combination chemotherapy for malaria. *Parasitol Today* 1996;12:399-01
16. Wiseman V, Kim M, Mutabingwa TK, Whitty CJ. Cost-effectiveness study of three antimalarial drug combinations in Tanzania. *Plos Med* 2006;3:373
17. Jambou RE, Legrand M, Niang N, et al. Resistance of Plasmodium falciparum field isolates to in-vitro artemether and point mutations of the SERCA-type PfATPase6. *Lancet* 2005;366:1960-63
18. Rosenthal PJ. Antimalarial drug discovery: old and new approaches. *J Exp Biol* 2003;206:3735-44
19. Noedl H. Artemisinine resistance: how can we find it? *Trends Parasitol* 2005;21:404-05
20. Farnsworth NR, Soejarto DD. Potential consequences of plant extinction in the United States in the current and future availability of prescription drugs. *Econ Bot* 1991;39:231-40
21. Ramharter M, Oyakhire S, Klouwenberg PK, et al. Artesunate-clindamycin versus quinine-clindamycin in the treatment of Plasmodium falciparum malaria: a randomized controlled trial. *Clin Infect Dis* 2005;40:1777-84
22. Brandão MGL, Grandi TSM, Rocha EMM, et al. Survey of medicinal plants used as antimalarials in the Amazon. *J Ethnopharmacol* 1992;36(2):175-82
23. Krettli AU, Andrade-Neto VF, Brandão MGL, Ferrari WM. The search for new antimalarial drugs from plants used to treat fever and malaria or plants randomly selected: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2001;96:1033-42
24. Carvalho LH, Krettli AU. Antimalarial chemotherapy with natural products and chemically defined molecules. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1991;86(Supp II):181-84
25. Brandão MGL, Krettli AU, Soares LSR, et al. Antimalarial activity of extracts and fractions from *Bidens pilosa* and other *Bidens* species (Asteraceae) correlated with the presence of acetylene and flavonoid compounds. *J Ethnopharmacol* 1997;57:131-38
26. Paulino-Filho HP, Gottlieb HE, Omita K, et al. *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke-Rhamnaceae. I Encontro Regional de Química, São Carlos, SP, Brasil, novembro 1979
27. Botelho MGA, Paulino-Filho HF, Krettli AU. Quimioterapia experimental antimalarica usando a Rhamnaceae *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke, vulgarmente denominada "cerveja-de-indio" contra o *Plasmodium berghei*. Anais do VII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, Oréades, 1981/1982;8:437- 42
28. Andrade-Neto VF, Brandão MGL, Nogueira F, et al. *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke (Rhamnaceae), a medicinal plant used to prevent malaria in the Amazon Region, hampers the development of *Plasmodium berghei* sporozoites. *Int J Parasitol* 2008;38(13):1505-11
29. Willcox ML, Bodeker G. Traditional herbal medicines for malaria. *Br Med J* 2004;329:1156-59
30. Bourdy G, Willcox ML, Ginsburg H, et al. Ethnopharmacology and malaria: New hypothetical leads or old efficient antimalarials? *Int J Parasitol* 2008;38:33-41
31. Trager WM, Jensen JB. Human malaria parasites in continuous culture. *Science* 1976;193:673-75
32. Peters W, Portus JH, Robinson BL. The four day suppressive in vivo antimalarial test. *Ann Trop Med Parasitol* 1975;69:155-71
33. Korolkovas A, Ferreira EI, Lima JD, Krettli AU. Antimalarial activity of saccharidic polymers of Dapsone and Sulfadimethoxine. *Chemotherapy* 1978;24:231-35
34. Carvalho LH, Brandão MGL, Santos-Filho D, et al. Antimalarial activity of crude extracts from Brazilian plants. Studied in vivo in *Plasmodium berghei*-infected mice and in vitro against *Plasmodium falciparum* in culture. *Braz J Med Biol Res* 1991;24:1113-23
35. Krettli AU, Pereira JP, Brener Z. Comparative study of experimental infections in mice inoculated with normal and chloroquine-resistant strains of *Plasmodium berghei*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1969;11(2):94-100

36. Afonso A, Hunt P, Cheesman S, et al. Malaria parasites can develop stable resistance to artemisinin but lack mutations in candidate genes atp6 (encoding the sarcoplasmic and endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase), tctp, mdr1, and cg10. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:480-89
37. Puri SK, Chandra R. Plasmodium vinckeii: selection of a strain exhibiting stable resistance to arteether. *Exp Parasitol* 2006;114:129-32
38. Krettli AU, Brener Z. Therapeutic activity of some sulfonamide compounds on normal and chloroquine-resistant strains of *Plasmodium berghei*. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1968;10(6):389-93
39. Brossi A, Uskokovic M, Gutzwiller J, et al. Antimalarial activity of natural, racemic and unnatural dihydroquinine, dihydroquinidine and their various racemic analogs in mice infected with *Plasmodium berghei*. *Experientia* 1971;27:1100-01
40. Brossi A, Uskokovic M, Gutzwiller J, et al. Antimalarial activity of racemic 3-epidihydroquinine, 3-epidihydroquinidine and their various racemic analogs in mice infected with *Plasmodium berghei*. *Experientia* 1973;32:97
41. Sanchez BAM, Mota MM, Sultan AA, Carvalho LH. *Plasmodium berghei* parasite transformed with green fluorescent protein for screening blood schizontocidal agents. *Int J Parasitol* 2004;34:485-90
42. Rieckmann KH, Sax LJ, Campbell GH, Mrema JE. Drug sensitivity of *Plasmodium falciparum*. An in vitro microtechnique. *Lancet* 1978;1:22-23
43. Carvalho LH, Rocha EMM, Raslan DS, et al. In vitro activity of natural and synthetic naphthoquinones against erythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*. *Braz J Med Biol Res* 1988;21:485-87
44. Andrade-Neto VF, Brandão MGL, Oliveira FQ, et al. Antimalarial activity of *Bidens pilosa* L. (Asteraceae) ethanol extracts from wild plants collected in various localities of plants cultivated in humus soil. *Phytother Res* 2004;18:634-39
45. Andrade-Neto VF, Silva T, Lopes LMX, et al. Antiplasmodial activity of aryltetralone lignans from *Holostylis reniformis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51(7):2346-50
46. Desjardins RE, Canfield CJ, Haynes JD, Chulay JD. Quantitative assessment of antimalarial activity in vitro a semiautomated microdilution technique. *Antimicrob Agents Chemother* 1979;16(6):710-18
47. Huber W, Koella JC. A comparison of three methods of estimating EC50 in studies of drug resistance of malaria parasites. *Acta Trop* 1993;55:257-61
48. Druilhe P, Moreno A, Blanc C, et al. A colorimetric in vitro drug sensitivity assay for *Plasmodium falciparum* based on a highly sensitive double-site lactate dehydrogenase antigen-capture enzyme-linked immunosorbent assay. *Am J Trop Med Hyg* 2001;64(5,6):233-41
49. Noedl H, Wernsdorfer WH, Miller RS, Wongsrichanalai C. Histidine-rich protein II: a novel approach to malaria drug sensitivity testing. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46(6):1658-64
50. Sanchez BAM, Varotti FP, Rodrigues FG, Carvalho LH. Validation of a *Plasmodium falciparum* parasite transformed with green fluorescent protein for antimalarial drug screening. *J Microbiol Methods* 2007;69:518-22
51. Cunico W, Cechinel CA, Bonacorso HG, et al. Antimalarial activity of 4-(5-trifluoromethyl-1H-pyrazol-1-yl)-chloroquine analogues. *Bioorg Med Chem Lett* 2006;16:649-53
52. Cunico W, Ferreira MLG, Ferreira TG, et al. Synthesis and antimalarial activity of novel hydroxyethylamines, potential aspartyl protease inhibitors. *Lett Drug Des Discov* 2008;5(3):178-81
53. Varotti FP, Botelho ACC, Andrade AA, et al. Synthesis, antimalarial activity and intracellular targets of MEFAS, a new hybrid compound derived from mefloquine and artesunate. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; doi:10.1128/AAC.00510-08
54. Brandão MGL, Botelho MGA, Krettli AU. Quimioterapia experimental antimalária com produtos naturais: uma abordagem mais racional? *Cien Cult* 1985;37(3):1152-63
55. Brandão MGL, Nery CGC, Mamão MAS, Krettli AU. Two methoxylated flavone glycosides from *Bidens pilosa*. *Phytochemistry* 1998;48(2):397-99
56. Alves TMA, Nagem TJ, Carvalho LH, et al. Antiplasmodial triterpene from *Vernonia brasiliiana*. *Planta Med* 1997;63(6):554-55
57. Pereira MM, Alcântara AFC, Piló-Veloso D, Raslan DS. NMR structural analysis of "Braznitidumine: a new indole alkaloid with 1,2,9-triazabicyclo[7.2.1] system, isolated from *Aspidosperma nitidum* (Apocynaceae)". *J Braz Chem Soc* 2006;17(7):1274-80
58. Andrade-Neto VF, Brandão MGL, Stehmann JR, et al. Antimalarial activity of Cinchona-like plants used to treat fever and malaria in Brazil. *J Ethnopharmacol* 2003;87:253-56
59. Available from: <http://dgp.cnpq.br/buscaoperacional/detalhegrupo.jsp?grupo=0039213F9D21GE>
60. Apers S, Vlietinck A, Pieters L. Lignans and neolignans as lead compounds. *Phytochem Rev* 2003;2:201-17
61. Skytte DM, Nielsen SF, Chen M, et al. Antimalarial and antiplasmodial activities of norneolignans. *Synth Sar J Med Chem* 2006;49:436-40
62. Carraz M, Jossang A, Franetich JF, et al. A plant-derived morphinan as a novel lead compound active against malaria liver stages. *Plos Med* 2006;3(12e513):2392-02
63. Brandão MGL, Lacailledubois MA, Teixeira MA, et al. C-31 Dammarane type saponin from the roots of *Ampelozizyphus amazonicus*. *Phytochemistry* 1993;34:1123-27
64. Carvalho LH, Ferrari WMS, Krettli AU. A method for screening drugs against the liver stages of malaria using *Plasmodium gallinaceum* and *Aedes* mosquitoes. *Braz J Med Biol Res* 1992;25:247-55
65. Camargo LM, Krettli AU. *Aedes fluviatilis* (Lutz), a new experimental host for *Plasmodium gallinaceum* (Brumpt). *J Parasitol* 1978;64:924-25
66. Gwadz RW, Koontz LC, Miller LH. *Plasmodium gallinaceum*: avian screen for drugs with radical curative properties. *Exp Parasitol* 1983;55:188-96
67. Krettli AU. The immune response to malaria sporozoite antigens in animal models and humans: a retrospective overview and present goals. *Cien Cult* 1994;46(5,6):446-54
68. Da Silva T, Krettli AU, Andrade-Neto VF, Lopes LMX. 2005. Lignans, and particularly aryltetralone lignans, etc and extracts in pharmaceutical compositions for treating or preventing

malaria. Brazilian Application PI (2005),
CODEN: BPXXDX BR 2004004986 A
20050531 CAN 144:286153 AN
2006:303021 CAPLUS PI (2005),
CODEN: BPXXDX BR 2004004986 A,
Rev Prop Ind 1774-86

Affiliation

Antoniana Ursine Krettli PhD MD
Professor
Instituto Rene Rachou – Fundação
Instituto Oswaldo Cruz –FIOCRUZ,
Malaria Laboratory,
Avenue Augusto de Lima 1715,
Belo Horizonte, MG,
CEP 30190 002, Brazil
Tel: +55 31 3349 7770; Fax: +55 31 3295 3115;
E-mail: akrettli@cpqrr.fiocruz.br

Survey of medicinal plants used as antimalarials in the Amazon

M.G.L. Brandão^a, T.S.M. Grandi^b, E.M.M. Rocha^{d,e}, D.R. Sawyer^c and
A.U. Krettli^{d,e}

^aLaboratório de Farmacognosia, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Av. Olegário Maciel 2360, 30180 Belo Horizonte, ^bDepartamento de Botânica, ICB, UFMG, ^cInstituto Sociedade População e Natureza, C.P. 09944, 70001 Brasília, ^dDepartamento de Parasitologia, ICB, UFMG and ^eCentro de Pesquisas René-Rachou, FIOCRUZ/MG, C.P. 1743, 30190 Belo Horizonte (Brazil)

(Received September 5, 1991; revision received February 7, 1992; accepted February 9, 1992)

Plants traditionally employed for the treatment of malaria in certain areas of Brazil, where this disease is prevalent, were surveyed by interviewing natives and migrants in the Amazon Region. Forty-one plants used for malarial treatment and/or for the related symptoms (fever and liver disorders) were collected and identified. Given the potential of Brazil's forests and medicinal plants, research on traditional plant-based remedies in this country may lead to the development of new drugs.

Key words: Amazon; malaria; survey; plants; remedies

Introduction

Malaria is a parasitic disease affecting millions of people in the tropical and subtropical regions of the world. In Brazil, according to the Ministry of Health, 578 000 cases of malaria were registered in 1989, of which the Amazon region was responsible for 96%. In this region, the situation has worsened since 1970 mainly because of internal migration. This causes the appearance of new endemic areas with an increasing number of patients with malaria. Control measures and treatment are increasingly difficult because of the resistance of the *Plasmodium falciparum* to chloroquine and other currently used antimalarials.

Despite great advances in experimental antimalarial vaccination, insecticides and traditional chemotherapy are still the main measures used to control the disease. Due to the appearance of resistant *P. falciparum* strains, several research groups are now working to develop new active compounds as alternatives to chloroquine. The approaches used for this work are synthesis of new substances or searching for natural products based on popular information. For example, artemisinin, a substance with a potent antimalarial action was isolated by Chinese scientists from the leaves of

Artemisia annua (Compositae), a plant used popularly for 2000 years as an antimalarial in China (Klayman, 1985). Other plants are also being tested and their active components determined and evaluated as antimalarials in several laboratories worldwide (O'Neill et al., 1987; Makinde et al., 1988; Weenen et al., 1990).

The Brazilian flora is one of the world's richest sources of plant material with pharmacological activity. In the Amazon region, where malaria is prevalent, a great floristic resource and traditional local folklore on the use of plants for medicinal purposes are found. In a previous paper (Brandão et al., 1985) we reported the results of tests on the antimalarial effects of crude extracts obtained from several plants collected in the southeast region of Brazil and provided an extensive compilation of data cited in the literature, documenting the use of different Brazilian plant species against malaria or fever. In the present report we describe the results of a survey designed to assess the use of plants against malaria in areas of the Brazilian Amazon region, where this disease is most prevalent.

Methodology

Study areas

Interviews were conducted in two different parts of the Brazilian Amazon: one in southern Pará State and the other in the northeast of Rondônia

Correspondence to: M.G.L. Brandão, Laboratório de Farmacognosia, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Av. Olegário Maciel 2360, 30180 Belo Horizonte, Brazil.



Fig. 1. Map of Brazil showing the States of Pará and Rondônia.

State (Fig. 1). Data were based on household surveys by asking the question 'Do you use any tea or plant to treat or prevent malaria?'

In the south of Pará State the interviews were

carried out in the Municipality of São Félix do Xingú, involving 4669 people living in urban and rural areas of Tucumã and Ourilândia and 20 inhabitants of São Félix do Xingú. The town of São Félix do Xingú is situated on the confluence of Fresco and Xingú rivers (Fig. 2A) and, unlike Tucumã and Ourilândia, is characteristic of the Amazon region. Almost the entire population is native and its economy is based on extractive activities. Tucumã and Ourilândia are urban areas that extend 10–15 km along the PA-279 road (Fig. 2B). These urban nuclei appeared in 1981 as a result of a colonization project (Tucumã), in addition to the expansion of the mining activity. In 1983 the population of this region consisted of about 12 000 inhabitants, all of them migrants.

In Rondônia the survey involved 3750 individuals and was carried out in the Machadinho Project, one of several colonization projects developed by the Brazilian government. This region is situated in the northeastern part of Rondônia State (Fig. 3) and occupies 5950 km², originally virgin rain forest. The inhabitants of Machadinho include some rubber tappers. In 1987, the 12 000 inhabitants were distributed in an urban area and in plots of 30–50 hectares. Most of the settlers

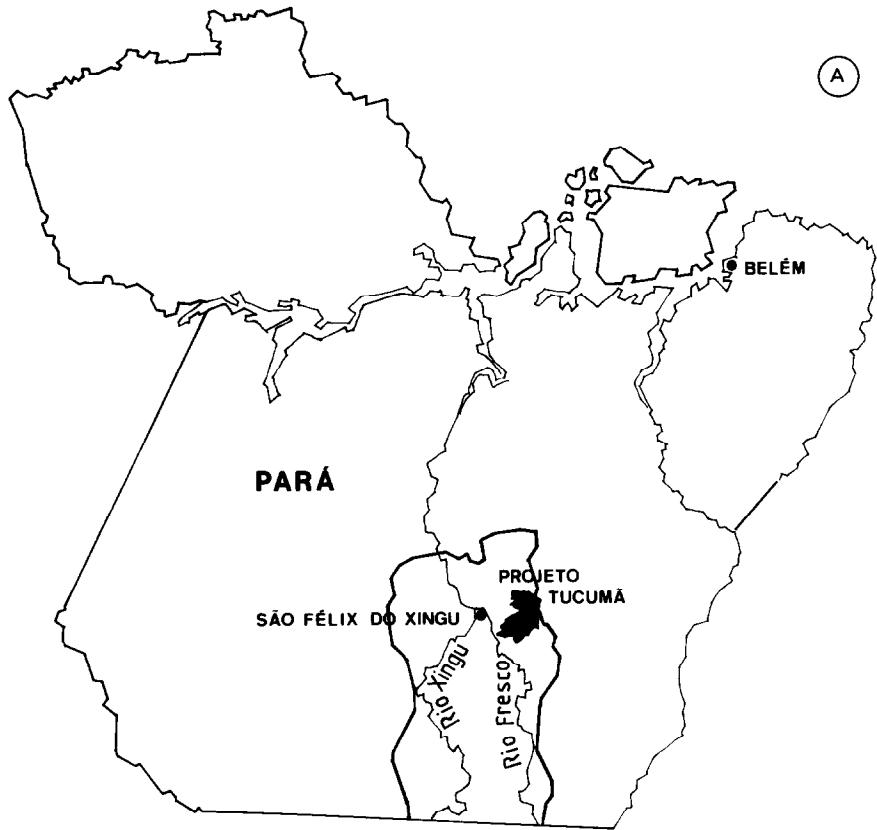
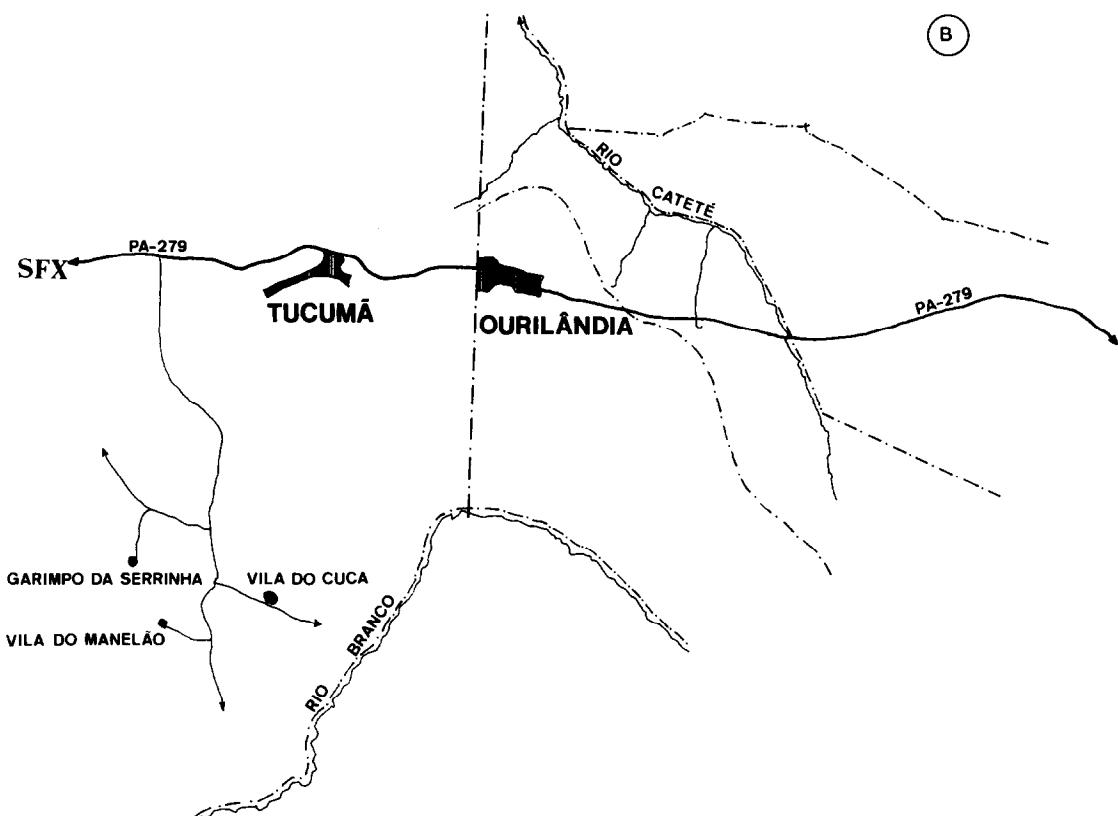


Fig. 2. (A) Map of Pará State showing the Tucumã Project. (B) Sketch map of the localities studied.



were migrants from the southern part of Brazil, with agriculture as their main economic activity.

The geography and climate of the southern part of Pará are similar to those of the central part of Brazil. The altitude varies between 150 and 400 m, with maximum and minimum rainfall occurring in the summer (October to March) and in the winter (April to September), respectively. The forest is considered transitional, presenting plant species characteristic of both the Amazon forest and that of Central Brazil. There is a predominance of tall trees, 15–20 m tall, with some species up to 50 m. On the other hand, the region where the Machadinho Project is located presents characteristics of the Amazon plain, namely low altitude (below 200 m), superhumid equatorial climate and a very short dry season (June to August). The forest is characterized by two basic types of vegetation: (1) a sparse heterogeneous mixture of very tall trees (up to 50 m), with a predominance of species of 25–30 m high and, (2) a floodplain forest with very dense vegetation, also with tall trees and undergrowth.

Survey

Three different approaches were employed in the field survey.

(a) Interviews by the CEDEPLAR/UFMG team utilizing several questions concerning the economic and social aspects of malaria transmission and control in the Amazon frontier. It contained two questions concerning treatment (where and how) and the use of plants to cure or to prevent malaria.

(b) Interviews with selected informants from the first survey (a) to compile data on the preparation and dosage form of the recorded plants and to collect parts of the plant used.

(c) Direct inquiries (interviews) with natives of the region.

Approach (a) was carried out with the collaboration of the interviewing team of CEDEPLAR, in June of 1984, in the southern part of Pará and in August of 1987, in Rondônia. Approaches (b) and (c) were conducted in Pará throughout 1984 and Rondônia throughout 1987. In São Félix do Xingú in 1984, only approach (c) was employed.

Collection and identification of plants

Voucher herbarium specimens were collected (by M.G.L.B.) with the assistance of the informants and were identified and deposited at the Herbarium of the Botany Department of Federal

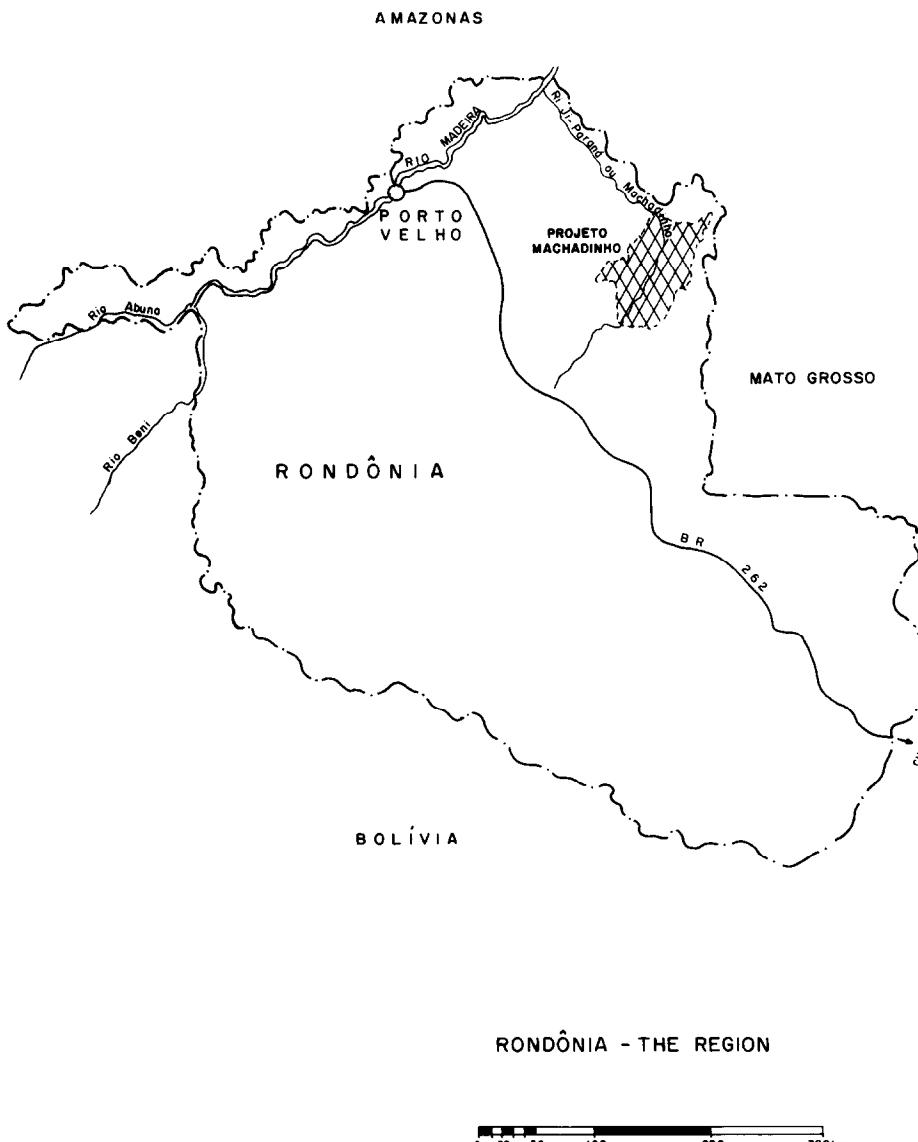


Fig. 3. Map of Rondônia State showing the location of Machadinho Project.

University of Minas Gerais-BHCB (Collection Nos. 5476–5496 and 12159). Some very common species in Brazil (fifteen species) as well as other sterile material collected (five species) were excluded.

Results

Forty-one plants were found to have been used as antimalarials; 40 to treat malaria and one to prevent it. Data for 21 of them are presented in Table 1. These include species name, family, local name, voucher specimen, its occurrence as either native or cultivated, region where it is used (São

Félix do Xingú, Tucumã-Ourilândia and/or Machadinho), indication (malaria, fever or liver disorders), part of plant used and references (where available).

Twenty plants were excluded from Table 1. Seven of these were referred only rarely (<1:1000) by the interviewers, all of which are used to treat liver disorders. They are *Carica papaya* L. (Caricaceae, Mamão), *Ageratum conyzoides* L. (Compositae, Mentrasto), *Phyllanthus* sp. (Euphorbiaceae, Quebra-pedra), *Melissa officinalis* L. (Labiatae, Erva Cidreira), *Copaifera officinalis* (Jacq.) L. (Leguminosae, Copáiba), *Psidium guayava* L. (Myrtaceae, Goiaba) and *Euterpe*

TABLE 1

PLANTS USED IN THE AMAZON REGION TO TREAT MALARIA, FEVER OR OTHER MALARIA-RELATED SYMPTOMS INCLUDING LIVER DISORDERS

Family/species (local name/ voucher specimen/ occurrence)	Use		Part ^b	Literature record
	Region ^a	Against		
APOCYNACEAE				
<i>Geissospermum sericeum</i> Benth. (Quina/ BHCB-5482/native)	SFX	Malaria	SB	Le Cointe, 1947; Correa, 1975; Cruz, 1979; Balbach, 1980
BIXACEAE				
<i>Bixa orellana</i> L. (Urucum/BHCB-5481/ native)	TOU	Malaria	SD	Correa, 1975
COMPOSITAE				
<i>Acanthospermum australe</i> (Loefl.) O. Kuntze (Carrapicho/ BHCB-5488/native)	MDO, SFX	Fever, malaria	PL, LF	Braga, 1960; Correa, 1975; Cruz, 1979
<i>Pluchea sagittalis</i> DC. (Quitoco/BHCB-5478/ cultivated)	TOU	Liver	LF	None
<i>Spilantes oleracea</i> L. (Jambu/BHCB-5485/ cultivated)	TOU, SFX	Liver	RT	None
<i>Vernonia condensata</i> Baker (Boldo/ BHCB-5490/cultivated)	TOU	Liver	PL	None
LABIATAE				
<i>Leonotis nepetaefolia</i> (L.) R.Br. (Cordão de Frade/ BHCB-5498/cultivated)	TOU	Liver	RT	Correa, 1975
<i>Ocimum</i> sp. (Alfavaca/BHCB-5493/ cultivated)	TOU	Liver	LF	None
LEGUMINOSAE				
<i>Bauhinia rutilans</i> Benth. (Cipó Escada/ BHCB-5492/native)	TOU	Liver	SB	None
<i>Desmodium adscendens</i> (SW.) DC. (Carrapicho/BHCB-5484/ cultivated)	TOU	Liver	RT	None
<i>Senna alata</i> (L.) Roxb. (Mata Pasto/BHCB-5487/ cultivated)	TOU	Fever	RT	None
<i>Senna occidentalis</i> (L.) Irvin et Barneby (Fedegoso/BHCB-5476/ native and cultivated)	TOU, MDO SFX	Malaria	RT	Le Cointe, 1947; Braga, 1960; Correa, 1975; Cruz, 1979; Balbach, 1980
<i>Senna spruceana</i> (Benth.) Irvin et Barneby (Fedegoso/BHCB-5489/ cultivated)	TOU	Fever	RT	None

TABLE 1 (continued)

Family/species (local name/ voucher specimen/ occurrence)	Use		Part ^b	Literature record
	Region ^a	Against		
MALVACEAE				
<i>Gossypium herbaceum</i> L. (Algodão/BHCB-5486/ cultivated)	TOU	Liver	LF	None
<i>Sida spinosa</i> L. (Malva/BHCB-5480/ cultivated)	TOU	Liver	LF	None
NYCTAGINACEAE				
<i>Boerhavia hirsuta</i> Willd. (Pega Pinto/ BHCB-5479/native)	TO	Malaria	LF	Cruz, 1979 Delorme and Miola, 1980; Neves, 1980
PIPERACEAE				
<i>Piper</i> sp. (Pimenta de Macaco/ BHCB-5496/native)	TO	Liver	PL	Cruz, 1979
POTULACACEAE				
<i>Portulaca pilosa</i> L. (Amor Crescido/ BHCB-5494/native)	TOU, SFX	Fever	LF	Neves, 1980
RHAMNACEAE				
<i>Ampelozizyphus</i> <i>amazonicus</i> Ducke (Cerveja de Indio/ BHCB-12159/native)	MDO	To prevent malaria	RT	Neves, 1980; Paulino-Filho, 1980
RUBIACEAE				
<i>Coutarea hexandra</i> (Jacq.) Schum. (Quina-Quina/ BHCB-5495/native)	MDO	Malaria	SB	Le Cointe, 1947
SOLANACEAE				
<i>Physalis brasiliensis</i> Sendt. (Camapu/ BHCB-5483/cultivated)	TOU	Liver	PL	Correa, 1975

^aRegions: MDO, Machadinho; SFX, São Félix do Xingú; TOU, Tucumã-Ourilândia.

^bFR, fruit; LF, leaf; PL, whole plant; RT, roots; SB, bark; SD, seeds.

oleracea Mart. (Palmae, Açaí). Eight other excluded plants are very common species: *Artemisia* sp. (Compositae, Artemisia), *Bidens bipinata* L. (Compositae, Picão), *Momordica charantia* L. (Cucurbitaceae, Melão de São Caetano), *Coleus barbatus* (Andrews) Benth. (Labiatae, Boldo), *Ruta graveolens* L. (Rutaceae, Arruda), *Solanum* sp. (Solanaceae, Jurubeba), *Stachytarpheta cayenensis* (Rich.) Vahl (Verbenaceae, Gervao) and *Solidago microglossa* DC. (Compositae, Rabo de Raposa).

Finally, five of the excluded plants are those commonly used and found in the Amazon. These are *Adenocalymna* sp. (Bignoniacées, Pau d'alho), *Tachia guyanensis* Aubl. (Gentianaceae, Cafarena), *Bertholletia excelsa* Humb. et Bonpl. (Lecythidaceae, Castanheira), *Bowdichia* sp. (Leguminosae, Sucupira) and *Aspidosperma nitidum* Benth. (Apocynaceae, Carapanaúba); they were sterile and did not have voucher numbers. Of the remaining 21 plants (Table 1), they are

distributed in 12 families, mostly in the Compositae and Leguminosae.

Of the original total of 41 plants, 13 are specifically used in the region as antimalarials, popularly referred to in the literature as anti-fever or antimalarial. Differences between information obtained in São Félix do Xingú, Tucumã-Ourilândia and Machadinho are probably due to cultural differences of the informants. Most inhabitants from Tucumã-Ourilândia and Machadinho, for instance, comprise families who came from other areas of Brazil and because of their lack of knowledge of the Amazon flora, they bring with them their own medicinal plants originally used in their place of origin for cultivation. All of the plants were said to be used in the form of decoction, except for *Ampelozizyphus amazonicus* (Rhamnaceae), which was used by maceration in cold water. This particular species is used as a prophylaxis to prevent malaria; chemical study of its roots is now being undertaken (Lins-Brandão et al., 1992). Nine plants were tested experimentally against malaria and two were found to be active in vitro (against *P. falciparum*) and in vivo (against *P. berghei* in rodents) (Carvalho et al., 1991).

Discussion and Conclusions

Despite the malarial control programs undertaken by SUCAM (now Fundação Nacional da Saúde), an agency of the Ministry of Health responsible for the control of diseases endemic to the area, the use of plants is still a widely practiced alternative for malaria treatment by the Amazonian inhabitants. This is indicated by the great number and diversity of plant species used.

No significant differences were found between plants used by the populations of Tucumã-Ourilândia and Machadinho. In both, the common practice is to use the plants as 'medicine' against liver disorders provoked by the disease; these plants comprise the majority and almost all of them are cultivated. Indeed, about 60% of the cited plants do not belong to the indigenous flora; they have been brought from other regions, then cultivated near homes. On the other hand, plants which are used specifically to treat malaria belong to the local flora. For instance, the bark of 'Carapanaúba' *Aspidosperma nitidum* (Apocynaceae) is used specifically for this purpose by the rubber tappers of the Machadinho Project. Plants belonging to the Apocynaceae are rich in alkaloids and are often very bitter. The inhabitants of the region believe that such a property (bitterness) is

an essential feature for efficacy against malaria; probably through association with the bitter taste of the real 'Quina' (*Cinchona* sp., Rubiaceae) from which quinine, used for the treatment of chloroquine-resistant *P. falciparum* strains is derived. Another plant known as 'Quina' (or 'Quina-Quina') is *Coutarea hexandra* (Rubiaceae), native to the Amazon, which is used as an antimalarial by the population of the Machadinho Project.

Three species are currently being used by the inhabitants of all the regions studied: *Momordica charantia* (Cucurbitaceae), *Senna occidentalis* (Leguminosae) and *Bertholletia excelsa* (Lecythidaceae). The first two are common in almost all of the Brazilian area and are cited in several popular references as antimalarial.

The popular use of *Artemisia* (Compositae) in the Amazon region is interesting because it is from the plant of the same genus (*A. annua*) that artemisinin, the new potent antimalarial shown active against chloroquine-resistant *P. falciparum* strains, was isolated (Klayman, 1985). The bitter leaves of *Artemisia* sp. are used by the populations of Tucumã-Ourilândia and Machadinho to treat malaria-related liver ailments.

The ethnopharmacological approach we used in our search for new antimalarial compounds from plants appears to have been more predictive than the random screening approach. Thus, we have tested 22 plants used to treat malaria and/or its related symptoms and four (18%) showed activity against *Plasmodium berghei* in mice. The active plants were: *Esenbeckia febrifuga* A. Juss. (Rutaceae) and *Lisanthus speciosus* Cham. et Schl. (Gentianaceae), collected in Minas Gerais (outside of the Amazonia) (Brandão et al., 1985) and *Acanthospermum australe* (Compositae) and *Tachia guyanensis* (Gentianaceae), collected in the Amazonian region (southern Pará State). Extracts from the barks of *Aspidosperma nitidum* (Apocynaceae), *Geissospermum sericeum* (Apocynaceae), *Bertholletia excelsa* (Lecythidaceae) and *Coutarea hexandra* (Rubiaceae) and from roots of *Leonotis nepetifolia* (Labiatae) and *Senna occidentalis* (Leguminosae), as well as from the leaves of *Boerhavia hirsuta* (Nyctaginaceae) (all used to treat malaria in the areas studied) were inactive against *P. berghei* (Carvalho et al., 1991). On the other hand, among 273 species tested based on random selection, we found only two (0.7%) that were active; these were *Vernonia brasiliiana* (L.) Druce (Compositae) and *Eupatorium squalidum* DC. (Compositae) (Carvalho and Krettli, 1991; Carvalho et al., 1991).

Since malaria remains one of the most prevalent diseases in the Amazon region, despite the extensive control program instituted by SUCAM, the search for alternative methods of treatment is justified. Considering the traditional phytotherapy practiced by the Brazilian people and the fact that some of the plants used that showed activity in experimental tests are common in areas where malaria is prevalent, these plants may eventually be standardized for malaria treatment, after appropriate tests of toxicity. As in the Chinese case, chemical and pharmacological studies of the Brazilian flora are hoped to result eventually in the discovery of new, antimalarial compound(s).

Acknowledgements

Field work was carried out as part of research on the economic and social aspects of the transmission and control of malaria in the Amazon frontier, undertaken as a joint project between CEDEPLAR (Center for Development and Regional Planning) and Federal University of Minas Gerais. Research support was received from the Section of Social and Economic Research of UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Disease (under grant 840137) and from the Superintendency of Public Health Campaign (SUCAM), an agency of the Ministry of Health and from Finep and CNPq (Brazil).

References

- Balbach, A. (1980) *A Flora Medicinal na Medicina Doméstica*, 17th Edn. Edições A Edificação do Lar, São Paulo, 921 pp.
- Braga, R. (1960) *Plantas do Nordeste, Especialmente do Ceará*. Imprensa Oficial, Fortaleza, 540 pp.
- Brandão, M.G.L., Botelho, M.G.A. and Krettli, A.U. (1985) Quimioterapia experimental antimalária com produtos naturais: uma abordagem mais racional? *Ciência e Cultura* 37 (7), 1152–1163.
- Carvalho, L.H. and Krettli, A.U. (1991) Antimalarial chemotherapy with natural products and chemically defined molecules. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 86, Suppl. II, 181–184.
- Carvalho, L.H., Brandão, M.G.L., Santos-Filho, D., Lopes, J.L.C. and Krettli, A.U. (1991) Antimalarial activity of crude extracts from brazilian plants studied in vivo in *Plasmodium berghei*-infected mice and in vitro against *Plasmodium falciparum* in culture. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 24, 1113–1123.
- Correa, M.P. (1975) *Dicionário das Plantas Uteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas*, Vols. 1–4. IBDF, Rio de Janeiro.
- Cruz, G.L. (1979) *Dicionário das Plantas Uteis do Brasil*. Civilizaçao Brasileira, Rio de Janeiro, 599 pp.
- Delorme, R. and Miola, H. (1980) *Pronto Socorro do Sertão: a Cura pelas Plantas*. Escola Superior de Teologia São Lourenço de Brindes, Porto Alegre, 120 pp.
- Klayman, D.L. (1985) Qinghaosu (artemisinin): an antimalarial from China. *Science* 228, 1049–1055.
- Le Cointe, P. (1947) *Amazônia Brasileira III: Árvores e Plantas Uteis*. Ed. Nacional, Rio de Janeiro, 506 pp.
- Lins-Brandão, M.G., Lacaille-Dubois, M.A., Teixeira, M.A. and Wagner, H. (1992) Triterpene saponins from the roots of *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke. *Phytochemistry* 31, 352–354.
- Makinde, J.M., Amusan, O.O. and Adesogan, E.K. (1988) The antimalarial activity of *Spathodea campanulata* stem bark extract on *Plasmodium berghei* in mice. *Planta Medica* 2, 122–125.
- Neves, E.S. (1980) *Introdução ao Levantamento da Flora Medicinal de Rondônia*. Secretaria de Ciência Tecnologia/Secretaria de Saúde, Porto Velho, 285 pp.
- O'Neill, M.J., Bray, D.H., Boardman, P., Chan, K.T., Phillipson, J.D., Warhurst, D.C. and Peters, W. (1987) Plants as sources of antimalarial drugs, Part 4: activity of *Brucea javanica* fruits against chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* in vitro and against *Plasmodium berghei* in vivo. *Journal of Natural Products* 50, 41–48.
- Paulino-Filho, H.F., Gottlieb, H.E., Tomika, K., Gottlieb, O.R., Yoshida, M. and Lemônica, I.P. (1979) *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke-Rhamnaceae. 1º Encontro Regional de Química, São Carlos, Novembro de 1979 (Ed. Sociedad Brasileira da Química) — sessão 2B, 63 pp.
- Weenen, H., Nkunya, M.H.H., Bray, D.H., Mwasumbi, L.B., Kinabo, L.S. and Kilimali, V.A.E.B. (1990) Antimalarial activity of Tanzanian medicinal plants. *Planta Medica* 56, 368–370.