

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**AVALIAÇÃO QUÍMICA E BIOLÓGICA DE EXTRATOS OBTIDOS DE ESPÉCIES
VEGETAIS DA FLORA AMAZÔNICA COMO NOVOS AGENTES
ANTIMALÁRICOS**

LEVI ABRAÃO MARINHO LIMA

MANAUS
2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

LEVI ABRAÃO MARINHO LIMA

**AVALIAÇÃO QUÍMICA E BIOLÓGICA DE EXTRATOS OBTIDOS DE ESPÉCIES
VEGETAIS DA FLORA AMAZÔNICA COMO NOVOS AGENTES
ANTIMALÁRICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Amazonas como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof.º Dr.º Jefferson Rocha de Andrade Silva

MANAUS
2014

LEVI ABRAÃO MARINHO LIMA

AVALIAÇÃO QUÍMICA E BIOLÓGICA DE EXTRATOS OBTIDOS DE
ESPÉCIES VEGETAIS DA FLORA AMAZÔNICA COMO NOVOS
AGENTES ANTIMALÁRICOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Aprovado em:

Banca Examinadora:

Prof.º Dr.º Jefferson Rocha de Andrade Silva - UFAM

Dr.ª Ana Claudia Fernandes Amaral – Fiocruz - RJ

Dr.ª Maria de Meneses Pereira - UFAM

AGRADECIMENTOS

Ao Prof.º Dr.º Jefferson Rocha de Andrade Silva por transmitir à mim os conhecimentos necessários para a realização deste projeto e pelo apoio concedido sempre durante minha orientação.

À Dr.ª Ana Cláudia Fernandes Amaral, por me receber no Laboratório de Produtos Naturais da Fundação Oswaldo Cruz-RJ e pelas inúmeras contribuições oferecidas em minha estada no Rio de Janeiro.

Ao Dr.º Hugo Caire de Castro Faria Neto por gentilmente me oferecer treinamento no cultivo e manejo de *Plasmodium* sp. no Laboratório de Imunofarmacologia na FIOCRUZ-RJ.

Ao Prof.º Dr.º Luiz André Mariúba e ao Instituto Leônidas e Maria Deane - Fiocruz-AM, pela prontidão em contribuir com várias das etapas realizadas nesse trabalho.

Ao Prof. Dr. James Dean Oliveira dos Santos Junior e ao Laboratório de Estatística – LabEst – pela importante contribuição no tratamento estatístico de parte dos dados experimentais gerados por esta dissertação.

Aos meus amados pais Alberto dos Santos Lima e Galdina de Jesus Meireles Marinho, pelo exemplo de amor e dedicação que me fizeram chegar até aqui. Amo vocês.

À minha querida noiva Fabiane Castro Santarém, por regar minha vida com seu amor e carinho. Eu amo você.

Aos colegas do Laboratório de Cromatografia, pela amizade e companheirismo e aos demais colegas do Laboratório de Produtos Naturais pela cordial convivência.

A todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

A malária é uma doença infectocontagiosa causadora da morte de milhares de pessoas todos os anos. A fim de encontrar substâncias capazes de impedir seu desenvolvimento, as espécies *Bocageopsis multiflora*, *Bocageopsis pleiosperma* e *Siparuna glygycarpa* foram avaliadas neste trabalho. Ensaio biológicos *in vitro* expuseram os extratos obtidos frente à cepas de *P. falciparum* resistente e sensíveis à cloroquina, evidenciando a presença de compostos antimaláricos nos extratos diclorometânico e etanólico de *B. multiflora*, diclorometânicos das cascas de *B. pleiosperma* e *S. glygycarpa*. Os valores de IC₅₀ apresentados estiveram entre 10 e 50 µg/mL. O mecanismos de ação desses extratos foram avaliados através dos ensaios de inibição da formação de β-hematina e interação com a enzima HGRPTase, indicando que os extratos diclorometânico das folhas de *B. multiflora* e das cascas de *B. pleiosperma* possivelmente inibam o parasita ao impedira formação de hemozoína, enquanto substâncias no extrato etanólico das folhas de *B. multiflora* interagem com a enzima HGRPTase, inibindo-a. Esses extratos mostraram-se inertes à células sanguíneas, em avaliação no ensaio hemolítico. Nas análises químicas foi possível observar a presença de substâncias importantes como terpenos, aromáticos e fenólicos nos extratos diclorometânico e etanólico de *B. multiflora*. No extrato diclorometânico das cascas de *B. pleiosperma* percebeu-se a presença majoritária intensa do composto Policarpol, identificado através de CG-EM. No extrato diclorometânico das cascas de *S. glygycarpa* a identificação de substâncias alcaloídicas foi evidenciada, indicando nessas espécies nativas da flora amazônica a presença de compostos antimaláricos.

Palavras-chave: Malária. β-hematina. Enzima HGRPTase. CCD. CG-EM. ANONACEAE. SIPARUNACEA.

ABSTRACT

Malaria is an infectious disease that causes the death of thousands of people every year. In order to find substances capable of preventing its development, species *Bocageopsis multiflora*, *Bocageopsis pleiosperma* and *Siparuna glygycarpa* were evaluated in this work. Biological assays *in vitro* exposed opposite the extracts of *P. falciparum* strains sensitive and resistant to chloroquine, indicating the presence of antimalarial compounds dichloromethane and ethanol extracts of *B. multiflora* the shells of dichlorometane *S.glygycarpa* and *B. pleiosperma*. IC50 values were given between 10 and 50 mg / mL. The mechanisms of action of these extracts were evaluated by assays of inhibition of the formation of β -hematin HGRPTase and interaction with the enzyme, indicating that the dichloromethane extracts of the leaves and bark *B. multiflora* and *B. pleiosperma* possibly inhibit the parasite to prevent the formation of hemozoin, while substances in the ethanol extract of the leaves of *B. multiflora* interact with HGRPTase enzyme, inhibiting it. These extracts were shown to be inert to blood cells, under evaluation in the hemolytic assay. Chemical analyzes we observed the presence of important substances such as terpenes, aromatic and phenolic in dichloromethane and ethanol extracts of *B. multiflora*. In dichloromethane extract of the bark of *B. pleiosperma* realized the intense majority presence of policarpol compound identified by GC-MS. In dichloromethane extract of the bark of *S. glygycarpa* identifying alkaloid substances was observed, indicating these species native to the Amazon flora the presence of antimalarial compounds.

Keywords: Malaria. β -hematin. HGRPTase enzyme. CCD. GC-MS. ANONACEAE. SIPARUNACEA.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. PERCENTUAL DE MORTES POR MALÁRIA EM 2012.	14
FIGURA 2. DISTRIBUIÇÃO DA MALÁRIA NO BRASIL EM 2012. FONTE: WHO, 2013.	14
FIGURA 3. <i>ANOPHELES DARLINGI</i> . FONTE: HTTP://PT.WIKIPEDIA.ORG	16
FIGURA 4. <i>PLASMODIUM FALCIPARUM</i> . FONTE: HTTP://WWW.MADRIMASD.ORG	17
FIGURA 5. CICLO DA MALÁRIA EM SERES HUMANOS. FONTE: WHO, 2012.	20
FIGURA 6. SUBSTÂNCIAS QUINOLÍNICAS. FONTE: ELABORADO PELO AUTOR.	22
FIGURA 7. MECANISMO DE AÇÃO DA CLOROQUINA. FONTE: O'NEILL, 1998.	22
FIGURA 8. MECANISMO DE AÇÃO DA ARTEMISININA. FONTE: YOUYOU, 2011.	23
FIGURA 9. MEDICAMENTOS APROVADOS NOS ÚLTIMOS 30 ANOS. FONTE: ADAPTADO DE NEWMAN & CRAGG, 2012.	25
FIGURA 10. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS. FONTE: ELABORADO PELO AUTOR.....	33
FIGURA 11. ENSAIO ANTIMALÁRICO. FONTE: ELABORADO PELO AUTOR.	35
FIGURA 12. DISPOSIÇÃO DAS AMOSTRAS. FONTE: ELABORADO PELO AUTOR.	35
FIGURA 13. GRÁFICO DE FLUORESCÊNCIA DO EXTRATO (A); CURVA DE CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA (B). FONTE: ELABORADO PELO AUTOR.	42
FIGURA 14. GRÁFICO DE FLUORESCÊNCIA DO EXTRATO (A); CURVA DE CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA (B). FONTE: ELABORADO PELO AUTOR.	43
FIGURA 15. GRÁFICO DE FLUORESCÊNCIA DO EXTRATO (A); CURVA DE CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA (B). FONTE: ELABORADO PELO AUTOR.	44
FIGURA 16. GRÁFICO DE FLUORESCÊNCIA DO EXTRATO (A); CURVA DE CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA (B). FONTE: ELABORADO PELO AUTOR.	45
FIGURA 17. GRÁFICO DE FLUORESCÊNCIA DO EXTRATO (A); CURVA DE CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA (B). FONTE: ELABORADO PELO AUTOR.	46
FIGURA 18. GRÁFICO DE FLUORESCÊNCIA DO EXTRATO (A); CURVA DE CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA (B). FONTE: ELABORADO PELO AUTOR.	47
FIGURA 19. GRÁFICO DE FLUORESCÊNCIA DO EXTRATO (A); CURVA DE CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA (B). FONTE: ELABORADO PELO AUTOR.	48
FIGURA 20. INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DE B-HEMATINA. FONTE: ELABORADO PELO AUTO.	50
FIGURA 21. ESQUEMA FUNCIONAL BIACORE. FONTE: GE HEALTHCARE, 2013.	52
FIGURA 22. <i>SCREENING</i> BIACORE FRENTE HGRPTASE. FONTE: ELABORADO PELO AUTOR.....	53
FIGURA 23. ENZIMA HGRPTASE. FONTE: BALENDIRAN, 1999.....	54

FIGURA 24. CONTROLE POSITIVO (A); EXTRATOS (B). FONTE: ELABORADO PELO AUTOR.....	55
FIGURA 25. PERFIL FITOQUÍMICO POR CCD. FONTE: ELABORADO PELO AUTOR.	
FIGURA 26. CROMATOGRAMA DE ÍON TOTAIS DE EHFBM. FONTE: ELABORADO PELO AUTC	
FIGURA 27. CROMATOGRAMA DE ÍONS TOTAIS DE EDFBM. FONTE: ELABORADO PELO AUTOR. 67	
FIGURA 28. CLAE-DAD DE EEFBM MONITORADO A 254 HM. FONTE: ELABORADO PELO AUTOR.	69
FIGURA 29. ÁCIDO CLOROGÊNICO. FONTE: ELABORADO PELO AUTOR.	70
FIGURA 30. CROMATOGRAMA DE ÍONS TOTAIS DE EDFBP. FONTE: ELABORADO PELO AUTOR. .	71
FIGURA 31. CROMATOGRAMA DE ÍONS TOTAIS DE EDCBP. FONTE: ELABORADO PELO AUTOR..	73
FIGURA 32. CROMATOGRAMA DE ÍONS TOTAIS DE EDFSG. FONTE: ELABORADO PELO AUTOR. .	77
FIGURA 33. CROMATOGRAMA DE ÍONS TOTAIS DE EDCSG. FONTE: ELABORADO PELO AUTOR..	78
FIGURA 34. FRACIONAMENTO POR COLUNA CROMATOGRÁFICA DE EDFBM. FONTE: ELABORADO PELO AUTOR.	81
FIGURA 35. AVALIAÇÃO POR CCD DAS FRAÇÕES DE EDFBM. FONTE: ELABORADO PELO AUTOR.	82
FIGURA 36. FRACIONAMENTO EM COLUNA CROMATOGRÁFICA DAS FRAÇÕES DE EEFBM. FONTE: ELABORADO PELO AUTOR.	83
FIGURA 37. AVALIAÇÃO POR CCD DAS FRAÇÕES DE EEFBM. FONTE: ELABORADO PELO AUTOR.	84
FIGURA 38. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INIBITÓRIA DE B-HEMATINA DAS FRAÇÕES DOS EXTRATOS EDFBM E EEFBM. FONTE: ELABORADO PELO AUTOR.....	85
FIGURA 39. AVALIAÇÃO HEMOLÍTICA DAS FRAÇÕES DE EDFBM E EEFBM. FONTE: ELABORADO PELO AUTOR.	86

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. NUMERAÇÃO DAS EXSICATAS - HERBÁRIO INPA.....	32
Tabela 2. Rendimento dos extratos obtidos por maceração.....	33
Tabela 3. Unidades de fluorescência por inibição de β -hematina.....	50
TABELA 4. AVALIAÇÕES BIOLÓGICAS E FARMACOLÓGICAS DOS EXTRATOS SELECIONADOS.	57
TABELA 5. REVELADORES UTILIZADOS EM CCD.....	60
TABELA 6. CLASSES QUÍMICAS IDENTIFICADAS POR CCD.	62
TABELA 7. SUBSTÂNCIAS PRESENTES NO EXTRATO EHFMB.	65
TABELA 8. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE EDFBM.....	68
TABELA 9: SINAIS OBTIDOS POR CLUE-DAD.....	70
TABELA 10. SUBSTÂNCIAS PRESENTES EM EDFBP.....	72
TABELA 11. SUBSTÂNCIAS PRESENTES EM EDCBP.	74
TABELA 12. SUBSTÂNCIAS PRESENTES EM EDFSG.	75
Tabela 13. Substâncias presentes em EDCSG.....	79
TABELA 14. UNIDADE DE EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA DAS FRAÇÕES DE EDFBM E EEFBM..	85

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	A MALÁRIA	13
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1	O MOSQUITO VETOR DA MALÁRIA	16
2.2	O AGENTE ETIOLÓGICO	17
2.3	O CICLO DA MALÁRIA EM HUMANOS	18
2.4	O CONTROLE DA MALÁRIA	21
2.5	O DESENVOLVIMENTO DE RESISTÊNCIA.....	23
2.6	A QUÍMICA DOS PRODUTOS NATURAIS	24
2.7	ESPÉCIES AMAZÔNICAS	26
2.7.1	A família SIPARUNACEAE.....	26
2.7.2	A família ANNONACEAE	28
3	JUSTIFICATIVA	30
4	OBJETIVOS	31
4.1	OBJETIVO GERAL	31
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
5	METODOLOGIA	32
5.1	MATERIAL BOTÂNICO	32
5.2	OBTENÇÃO DE EXTRATOS E FRAÇÕES	32
5.3	ENSAIOS BIOLÓGICOS.....	34
5.3.1	Avaliação da atividade inibitória frente <i>P. falciparum</i> (3D7 eW2).....	34
5.3.2	Avaliação da atividade inibitória da formação de β -hematina	37
5.3.3	Avaliação da capacidade inibitória de HGRPTase	38
5.3.4	Avaliação da capacidade hemolítica.....	38
5.4	ANÁLISES QUÍMICAS	39
5.4.1	Avaliação do perfil cromatográfico em Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	39
5.4.2	Fracionamento por Cromatografia em coluna	39

5.4.3 Avaliação do perfil cromatográfico por Cromatografia em Fase Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM)	39
5.4.4 Avaliação do perfil cromatográfico por Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplado ao Espectro de Massas –CLUE-DAD-EM	40
6 RESULTADOS	41
CAPÍTULO 1: ENSAIOS BIOLÓGICOS	41
6.1. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INIBITÓRIA DE <i>P. FALCIPARUM</i> (3D7 E W2).....	42
6.1.1 Inibição parasitária pelo extrato hexano das folhas de <i>B. multiflora</i> - EHF _{BM} ...	42
6.1.2 Inibição parasitária pelo extrato diclorometano das folhas de <i>B. multiflora</i> – EDF _{BM}	43
6.1.3 Inibição parasitária pelo extrato etanólico das folhas de <i>B. multiflora</i> – EE _{FBM} . 44	
6.1.4 Inibição parasitária pelo extrato diclorometano das folhas de <i>B. multiflora</i> - EDF _{BP}	45
6.1.5 Inibição parasitária pelo extrato Diclorometano das Cascas de <i>B. pleiosperma</i> - EDC _{BP}	46
6.1.6 Inibição parasitária pelo extrato diclorometano das folhas de <i>S. glycyarpa</i> - EDF _{S_G}	47
6.1.7 Inibição parasitária pelo extrato diclorometano das cascas de <i>S. glycyarpa</i> - EDF _{S_G}	48
6.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INIBITÓRIA DA FORMAÇÃO DE B-HEMATINA..	49
6.3 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE INIBITÓRIA DE HGRPTASE.....	51
6.4 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE HEMOLÍTICA	55
CAPÍTULO 2: AVALIAÇÕES QUÍMICAS	59
6.5 AVALIAÇÃO DO PERFIL CROMATOGRÁFICO EM CCD	60
6.6 AVALIAÇÃO DO PERFIL CROMATOGRÁFICO POR CG-EM E CLAE	63
6.6.1 Perfil do extrato hexânico das folhas de <i>B. multiflora</i> –EHF _{BM}	63
6.6.2 Perfil do extrato diclorometano das folhas de <i>B. multiflora</i> - EDF _{BM}	66
6.6.3 Perfil do extrato etanólico das folhas de <i>B. multiflora</i> – EE _{FBM}	69
6.6.4 Perfil do extrato diclorometano das folhas de <i>B. pleiosperma</i> – EDF _{BP}	71
6.6.5 Perfil do extrato diclorometano das cascas de <i>B. pleiosperma</i> –EDC _{BP}	73
6.6.6 Perfil do extrato diclorometano das folhas de <i>S. glycyarpa</i> - EDF _{S_G}	75
6.6.7 Perfil do extrato diclorometano das cascas de <i>S. glycyarpa</i> –EDC _{SG}	77

CAPÍTULO 3: FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS ATIVOS	80
6.6.8 <i>Fracionamento e avaliação em CCD dos extratos EDFBM e EEFBM</i>	<i>81</i>
6.6.9 <i>Avaliação biológica das frações obtidas dos extratos EDFBM e EEFBM</i>	<i>84</i>
6.9.10 <i>Ensaio Hemolítico das frações dos extratos EDFBM e EEFBM.....</i>	<i>85</i>
7 CONCLUSÃO	87
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90

1 INTRODUÇÃO

1.1 A MALÁRIA

Há cerca de 10.000 anos, um parasita causador de infecções sanguíneas em chimpanzés adquiriu a capacidade de infectar também seres humanos, dando origem à uma das doenças mais mortais e antigas já descritas pela humanidade, e que ainda hoje, exerce forte influência na vida de quase um terço da população mundial, a malária (RICH *et. al.*, 2009).

A malária se manifesta no hospedeiro humano através de episódios periódicos de febre seguidos de sudorese de duração variável. Quando não tratada, a febre pode atingir picos de 40°C juntamente com fortes dores de cabeça. Mialgia, náusea e vômito também são comuns. Nos casos mais graves, a febre pode atingir quadro crônico acima de 41°C, causando hemorragia, coma ou mesmo a morte do hospedeiro (BRASIL, 2013).

Atualmente, cerca de 3,4 bilhões de pessoas vivem em áreas onde o risco de se contrair malária é considerado elevado segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS). Nessas regiões foram confirmados no ano de 2012 aproximadamente 207 milhões de casos de infecção e 627 mil mortes causadas por malária (Figura 1). Em muitos desses países, a pobreza e demais fatores associados à qualidade de vida estão diretamente relacionados com a malária, impedindo o avanço social e tecnológico dessas regiões (WHO, 2013).

A região do planeta que apresenta o maior número de casos e mortes por malária é a África subsaariana. Além de apresentar condições ideais para o desenvolvimento de mosquitos vetores em seu território, grande parte da sua população apresenta algum tipo de imunodeficiência como portadores do vírus HIV, elevado número de mulheres gestantes e crianças com menos de cinco anos de idade, tornando-os mais susceptíveis à infecção (WHO, 2013).

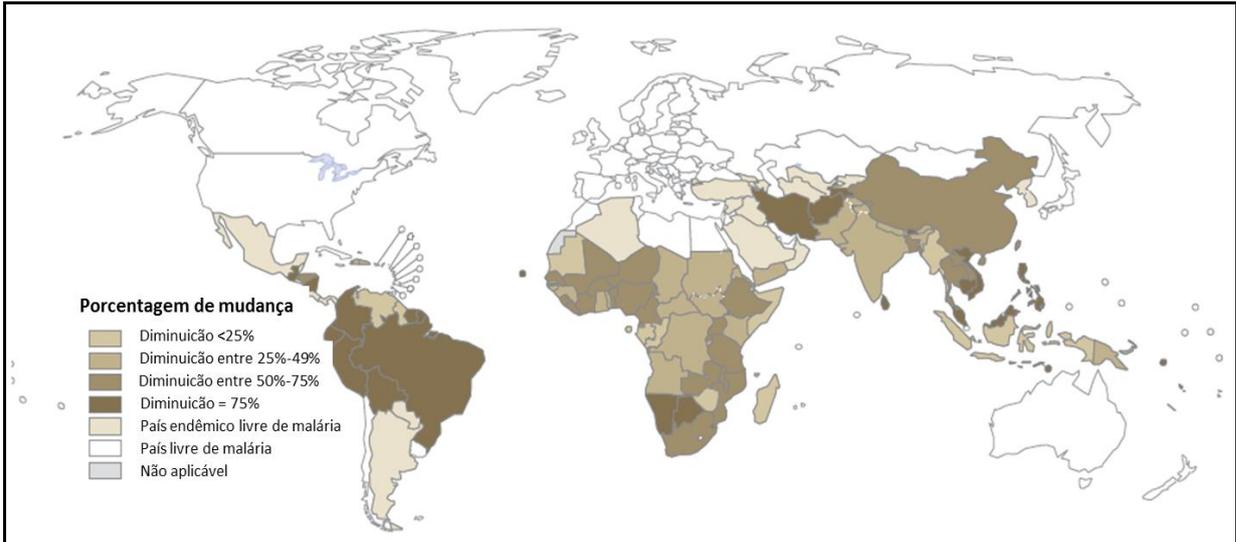


Figura 1. Percentual de mortes por malária em 2012.

No Brasil 99,7% dos casos de malária são registrados na Região Amazônica, composta pelos estados do Acre, Amazonas, Amapá, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins (Figura 2). No ano de 2011 foram registrados 266.348 casos e 69 mortes por malária nessa região. Em 2012 foram 238.502 casos e 65 mortes, evidenciando a malária ainda como uma doença de elevada prevalência e morbidade no Brasil, apesar do decréscimo no número de casos (WHO, 2013).

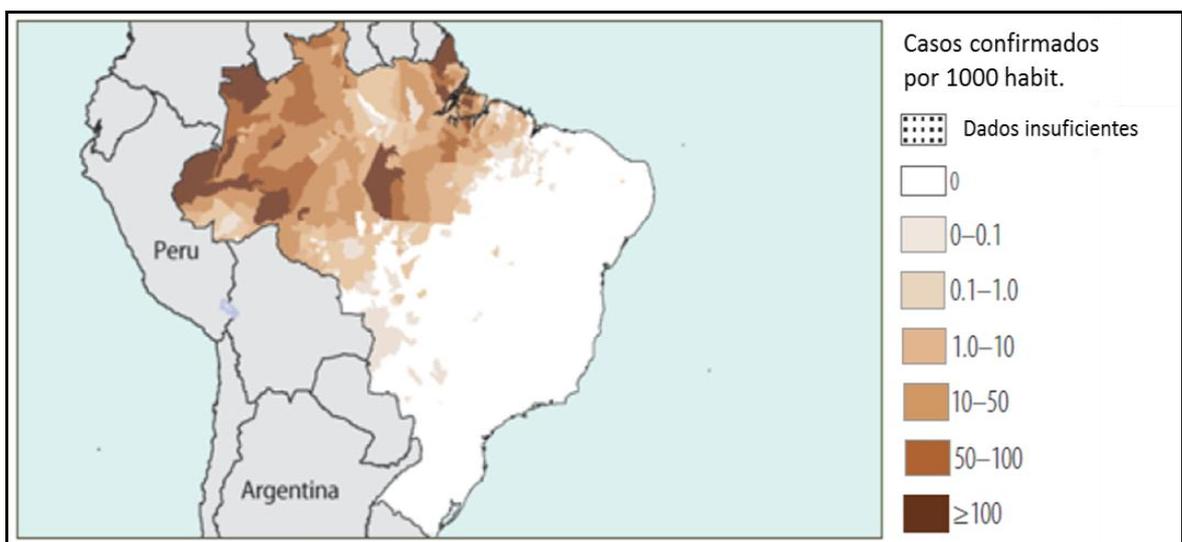


Figura 2. Distribuição da malária no Brasil em 2012. Fonte: WHO, 2013.

Dentre as medidas preventivas oferecidas pelo Sistema Único de Saúde (SUS) estão a distribuição de mosquiteiros tratados com inseticidas e a pulverização residual intra-

domiciliar. Como medida terapêutica está o diagnóstico laboratorial e o tratamento através de quimioterápicos, oferecidos gratuitamente nas Unidades Básicas de Saúde (UBS)(BRASIL, 2013).

Mesmo com toda a oferta de prevenção e tratamento, grande parte da população amazônica não tem acesso aos recursos oferecidos pelo SUS, principalmente os moradores de comunidades ribeirinhas, isolados geograficamente dos centros urbanos. Isso torna o conhecimento etnobotânico amplamente difundido nessas regiões, e dentre o acervo de espécies muitas delas são capazes de remediar os sintomas da malária, tornando-as alvo de pesquisas que buscam nos recursos naturais novos compostos precursores de medicamentos antimaláricos (OLIVEIRA & FERREIRA *et. al.*, 2010).

Em face de tal problemática o presente trabalho apresenta como proposto identificar nas cascas e folhas das espécies *Siparuna Glycyarpa*, *Bocageopsis multiflora* e *Bocageopsis pleiosperma*, espécies nativas da flora amazônica, substâncias capazes de inibir o parasita causador da malária em seres humanos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O MOSQUITO VETOR DA MALÁRIA

A malária é transmitida através de mosquitos fêmeas do gênero *Anopheles*. Apesar de ser formado por aproximadamente quatrocentas espécies um número reduzido tem real importância epidemiológica para a malária em cada região onde ocorre. No Brasil as espécies transmissoras de malária humana são *A. darlingi*, *A. deaneorum*, *A. albitarsis*, *A. aquasalis* e *A. brasiliensis* (WHO, 2013; HIRSCH & BECKER, 2009).

Essas espécies apresentam como principal característica a preferência por clima úmido e quente, sendo possível encontrá-las em praticamente todos os países com clima tropical do planeta. Além disso, possuem comportamento alimentar antropofágico, transmitindo o parasita causador da malária para seres humanos a cada repasto sanguíneo quando se encontram infectados (CONSOLI & LORENZI, 1994).

No Brasil, quase todos os casos de malária ocorrem na Região Amazônica. Além de apresentar ambiente propício para o desenvolvimento de anofelinos, o desmatamento das florestas tem contribuído para a proliferação de algumas espécies, dentre elas está a *Anopheles darlingi*. Responsável por 95% dos casos de malária registrados em 2012 essa espécie está presente em quase todos os estados do país, apesar da malária concentrar-se na região norte. Resistente a alterações no ambiente e a inseticidas comercializados para o combate da malária, essa espécie é considerada não apenas um risco à saúde como também um alvo para se combater a proliferação da malária (Figura 3) (OLIVEIRA-FERREIRA *et. al.*, 2010; WHO, 2013).



Figura 3. *Anopheles darlingi*. **Fonte:** <http://pt.wikipedia.org>

2.2 O AGENTE ETIOLÓGICO

Os parasitas infectantes causadores da malária pertencem ao gênero *Plasmodium*, composto por aproximadamente 100 espécies. As espécies causadoras de malária em seres humanos são *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* e *P. knowlesi* (KANTELE & JOKIRANTA, 2011; WHO,2013).

A espécie *P. Falciparum* é dentre as causadoras de malária em seres humanos a que manifesta a enfermidade em sua forma mais grave. Diferente das demais espécies, o *P. falciparum* possui a capacidade de invadir eritrócitos jovens e maduros, e dentro deles, sua reprodução acontece de maneira acelerada, acentuando os sintomas da doença. Além disso, essa espécie é capaz de promover a adesão dos eritrócitos infectados às paredes dos vasos sanguíneos, permanecendo no organismo do hospedeiro por mais tempo. Outra particularidade da espécie é a capacidade de formar rosetas, denominação dada ao eritrócito infectado rodeado por eritrócitos saudáveis, escondendo-se do sistema imunológico do hospedeiro. Essas rosetas também causam o enfarto de vasos sanguíneos que levam sangue ao cérebro, causando a assim denominada malária cerebral. Seu ciclo varia entre 36 e 48 horas, causando febre entre dois e três dias (febre terçã) (WHO, 2010).



Figura 4. *Plasmodium falciparum*. Fonte: <http://www.madrimasd.org>

A espécie *P. vivax* não desenvolve sintomas tão acentuados no organismo humano quanto a espécie anterior. Sua importância epidemiológica está relacionada principalmente a sua distribuição geográfica, sendo a maior causadora de infecções de malária humana nas regiões endêmicas.

A invasão eritrocítica promovida por essa espécie é seletiva, invadir exclusivamente eritrócitos jovens. Alguns parasitas dessa espécie permanecem dentro do hepatócito do hospedeiro enquanto outros continuam o ciclo da malária provocando os sintomas da doença. Após o tratamento, esses parasitas que permaneceram latentes nos hepatócitos finalmente migram para a corrente sanguínea do hospedeiro, causando novamente os sintomas da malária em uma espécie de recaída da doença. Essa forma latente do parasita é denominada de hipnozoítos. Seu ciclo é de quarenta e oito horas, causando acessos febris a cada três dias (febre quartã)(BAIRD, 2007; MENDIS *et. al.*, 2001).

A espécie *P. malariae* também causa malária em seres humanos, e está presente em todas as regiões onde ocorre malária no mundo. Apesar de ser considerado menos grave que a malária causada pelas espécies descritas anteriormente, os sintomas causados por essa espécie podem apresentar ciclo sanguíneo prolongado, causando por mais tempo morbidade no hospedeiro. O ciclo da malária causada por essa espécie causa febre quartã(COLLINS *et. al.*, 2007).

A espécie *P. ovale* é causadora de febre terça em seres humanos, e por tornar os eritrócitos infectados no formato oval recebe tal designação. É considerada mais rara que as espécies descritas anteriormente e assemelha-se à *P. vivax* ao formar hipnozoítos (COLLINS *et. al.* 2005).

Nos últimos 80 anos a malária humana era uma doença provocada por apenas quatro espécies de protozoários. Em 2008, centenas de casos de malária foram registrados na Malásia e em outras regiões do sudeste asiático, todos ocasionados por uma nova espécie, o *P. knowlesi*, que até então pensava-se infectar exclusivamente primatas não humanos. O quadro clínico da malária provocada por essa espécie assemelha-se à ocasionada por *P. falciparum* e segundo a OMS, é tão grave quanto à provocada por *P. falciparum* (KANTELE & JOKIRANTA, 2011).

2.3 O CICLO DA MALÁRIA EM HUMANOS

Em seres humanos, o ciclo de vida do *Plasmodium* sp. tem início quando um mosquito fêmea do gênero *Anopheles* pica a pele de um humano sadio e nutre-se de seu sangue, em um processo denominado de repasto sanguíneo. Enquanto o mosquito ingere o sangue, cerca de 200 parasitas migram de suas glândulas salivares para a corrente sanguínea do hospedeiro (SANGYEON *et. al.*, 2012).

Seguindo o fluxo sanguíneo, os parasitas percorrem parte do organismo do hospedeiro ao encontro do fígado, invadindo suas células. O resultado dessa invasão dá origem a uma célula deformada, que nutre com seus compostos orgânicos a reprodução assexuada do parasita que ocorre por meio de meiose. Aos parasitas formados durante essa reprodução dá-se o nome de “esquizontes teciduais” (COX, 2010). É durante essa etapa do ciclo que o hospedeiro sente fortes dores no fígado, provocando contumaz inchaço abdominal e icterícia que podem perdurar por seis dias em infecções causadas por *P. falciparum*, oito dias para *P. vivax* e semanas para *P. malariae* e *P. ovale* (BRASIL, 2013).

Após uma série de replicações, os hepatócitos se rompem, liberando na corrente sanguínea do hospedeiro uma nova forma evolutiva do parasita, os merozoítos, orientados geneticamente à invasão específica de eritrócitos, dando início ao ciclo intraeritrocítico. No interior dos eritrócitos, os merozoítos tornam-se unicelulares e tomam a forma de anel, evoluindo para a forma de trofozoítos, desenvolvendo células multinucleadas. Os trofozoítos por sua vez evoluem à esquizontes, os quais replicam-se de maneira assexuada milhares de vezes até o rompimento da hemácia, liberando na corrente sanguínea uma nova geração de merozoítos, que infectarão milhares de outras hemácias sadias, dando continuidade ao ciclo-eritrocítico ou esquizogonia sanguínea (SANGYEON, 2012). Em infecções causadas por *P. falciparum* e *P. malariae*, os hepatócitos infectados rompem-se todos ao mesmo tempo. Nas infecções causadas por *P. ovale* e *P. vivax*, há o rompimento latente desses hepatócitos, provocado por esquizontes teciduais denominados de hipnozoítos, responsáveis por recaídas da doença (ANTINORI, 2012).

Durante essa fase do ciclo da malária, os parasitas perdem a capacidade de sintetizar bases de purinas em seu metabolismo. Necessitando uma nova fonte desse precursor de proteínas, o parasita degrada moléculas de hemoglobina presentes no eritrócito em seu vacúolo digestivo, obtendo assim as bases de purinas necessárias para sua sobrevivência. Apesar de fornecer compostos vitais para o desenvolvimento parasitário, a degradação da hemoglobina também resulta na formação de um composto tóxico altamente reativo com a membrana de seu vacúolo digestivo conhecida como Ferriprotoporfirina IX (Fe(III)PPIX). Para se proteger desse resíduo o parasita promove a sua polimerização através de enzimas e do pH ácido de seu interior, formando assim um composto inerte denominado de pigmento malárico ou hemozoína (GOLDBERG, 1990; GOLAN, 2009).

Após algumas gerações de merozoítos intraeritrocíticos, uma pequena quantidade de merozoítos não volta a invadir hemácias, diferenciando-se por sua vez em gametócitos

masculinos e femininos, livres na corrente sanguínea do hospedeiro. Em um novo repasto sanguíneo, esses gametócitos são ingeridos juntamente com o sangue para o interior do sistema digestivo de um anofelino sadio, dando continuidade ao ciclo da malária humano no seu vetor (DELVES *et. al.*, 2012).

No corpo do vetor, os gametas penetram uma espessa camada de membranas que envolvem as células epiteliais do abdome do mosquito, onde se fecundam, dando origem ao oocineto (célula epitelial abdominal parasitada). Nele, milhares de esporozoítos são originados de maneira sexuada até seu rompimento, liberando na corrente sanguínea do vetor milhares de parasitas que migram até suas glândulas salivares. A partir daí o mosquito torna-se transmissor de *Plasmodium* sp. pelo restante de sua vida, e a cada repasto sanguíneo, inoculará sob a pele do hospedeiro humano aproximadamente 200 esporozoítos, dando continuidade ao ciclo da malária em seres humanos (Figura 5) (COX, 2010).

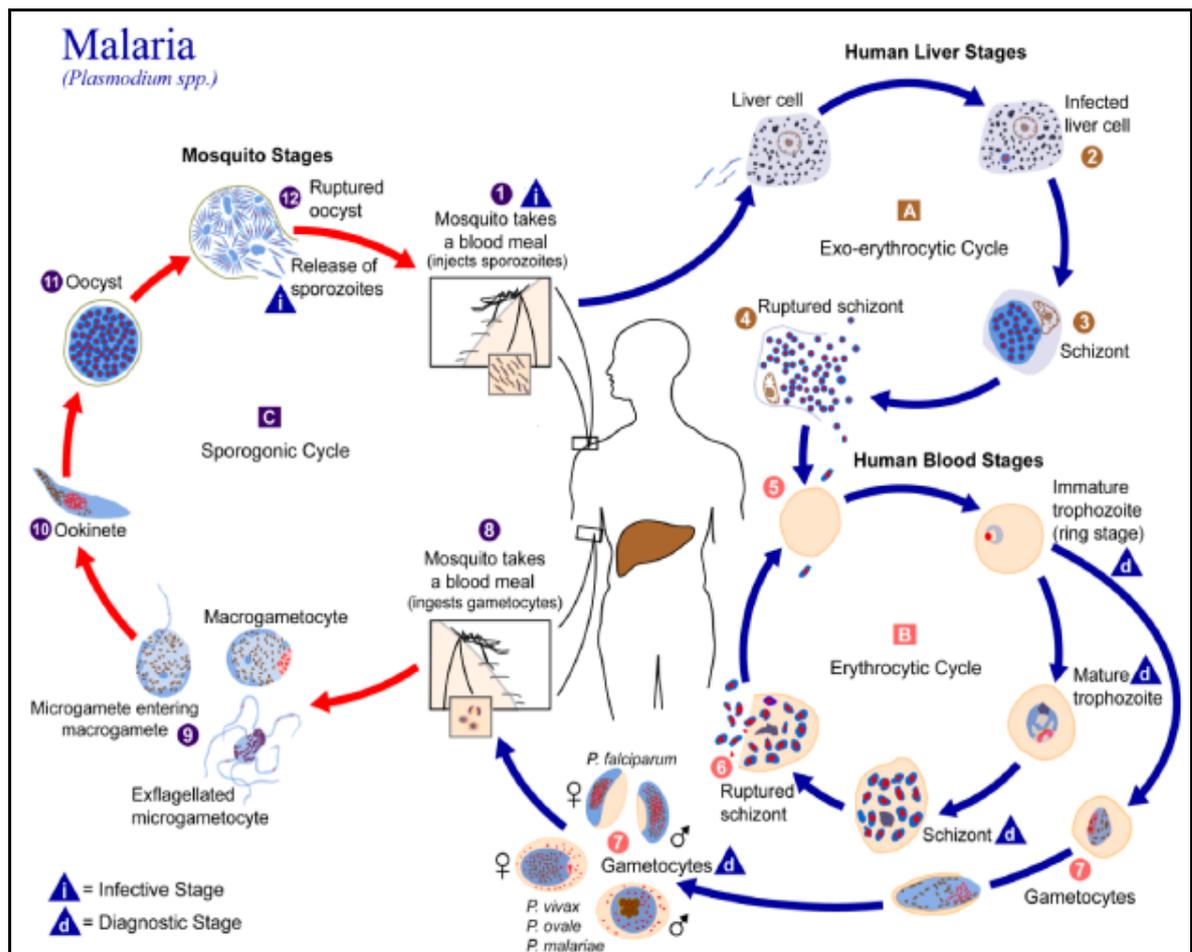


Figura 5. Ciclo da malária em seres humanos. **Fonte:** WHO, 2012.

2.4 O CONTROLE DA MALÁRIA

A principal forma prevenção da malária segundo a OMS é controlando os mosquitos vetores. Assim sendo, 88 países em todo o mundo distribuem gratuitamente mosquiteiros tratados com inseticidas, ação que contribui para a diminuição em vinte e cinco por cento no número de casos em gestantes e em crianças menores de cinco anos de idade nas regiões subsaarianas da África desde 2010 (WHO,2013).

Outra recomendação da OMS é a pulverização residual intradomiciliar. Em 2012 aproximadamente 4% da população mundial que sofria grande risco de contrair malária manteve-se protegida por essa intervenção. Apesar de eficaz, a utilização da pulverização residual sofreu um decréscimo no último ano devido ao aumento no preço dos inseticidas utilizados habitualmente. Outro fator limitante foram as restrições impostas ao uso de algumas substâncias inseticidas por promoverem resistência nos mosquitos vetores além de possíveis riscos à saúde dos residentes (WHO, 2010).

A quimioterapia continua sendo o método mais eficaz na tentativa de erradicação da malária. A principal função dos antimaláricos é interromper fases do ciclo evolutivo do parasita. Atualmente os antimaláricos atuam inibindo a esquizogonia sanguínea, as formas teciduais latentes e a transmissão das formas sexuadas do parasita(GOLAN, 2009).

Os principais antimaláricos foram extraídos de plantas medicinais, como a quinina e a artemisinina, ou ainda, possuem suas estruturas moleculares baseadas em tais substâncias, como a cloroquina e a mefloquina, que durante décadas destacaram-se como antimaláricos de primeira linha (HYDE, 2007).

A quinina (Figura 6) foi a primeira substância antimalárica caracterizada molecularmente após ser extraída das cascas da *Cinchona* sp. por Pelletier e Caventou em 1820. Essa espécie é nativa da América do Sul e foi descrita pela primeira vez no século XVIII por jesuítas, que relataram o uso de suas cascas por nativos da região contra febres intermitentes, principal sintoma da malária (OLIVEIRA & SZCZARBOWSKI, 2009).

A quinina inspirou a síntese da cloroquina (Figura 6), produzida por pesquisadores americanos durante a guerra no Vietnam após o exército americano sofrer mais baixas de contingente pela malária do que pelos próprios vietcongues. A eficácia contra malária e o baixo custo de produção dessa substância o tornaram como a principal esperança de erradicação da malária. Porém, os relatórios da OMS de 1950relataram o surgimento de cepas de *P. falciparum* resistentes à cloroquina em algumas regiões do continente africano, e com o

passar dos anos, cada vez mais regiões relataram cepas resistentes à cloroquina. Atualmente existem cepas resistentes a esse medicamento em todas as regiões onde ocorre a malária no mundo (FRANÇA, 2008; SÁ, 2011).

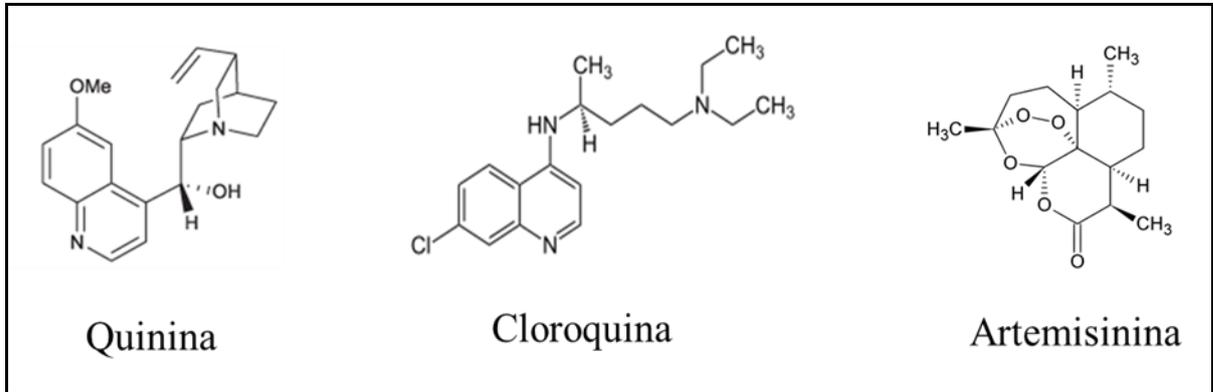


Figura 6. Substâncias quinolínicas. **Fonte:** Elaborado pelo autor.

O mecanismo de ação mais aceito para a cloroquina é a formação de uma ligação covalente entre ela e a porção heme da Fe(III)PPIX, impedindo que esse composto tóxico se torne no compostos inerte hemozoína. Uma vez livre no vacúolo digestivo do parasita, a Fe(III)PPIX provoca a oxidação de sua membrana, além de danos irreversíveis à proteínas, ao DNA e aos lipídeos. Além de se posicionar entre os monômeros de Fe(III)PPIX, a cloroquina ainda possui a capacidade de inibir a ação da enzima heme polimerase (Figura 7) (GOLAN, 2009; SULLIVAN, 2002; RADFAR *et. al.*, 2008).

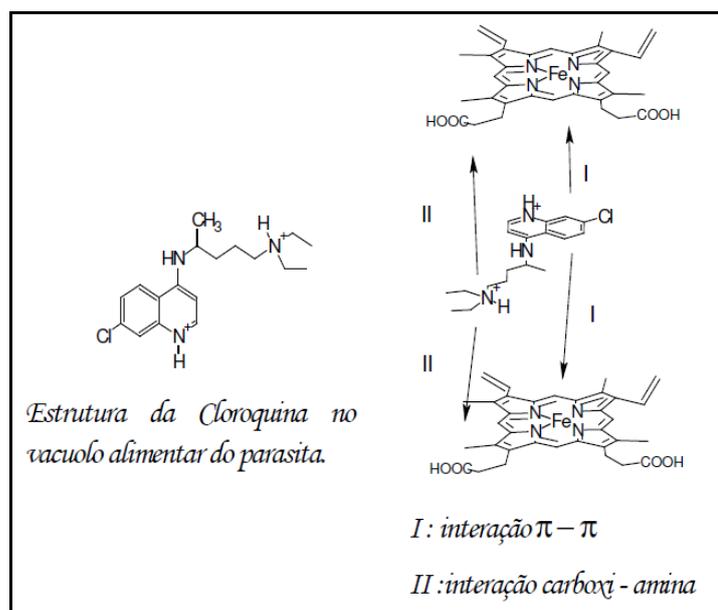


Figura 7. Mecanismo de ação da cloroquina. **Fonte:** O'NEILL, 1998.

A *Artemisia annua* L., ou Qinghaosu como é popularmente conhecida, é uma planta medicinal tradicional da cultura chinesa. Em 1967, a pesquisadora Tu You You avaliou milhares de espécies nativas da flora chinesa a fim de encontrar novos agentes antimaláricos, encontrando no extrato etanólico dessa espécie o composto mais eficaz conhecido atualmente no combate à malária, a artemisinina. Essa espécie já havia prescrita contra febres intermitentes em um manuscrito compilado há 1600 anos (YOUYOU, 2011).

O mecanismo de ação da artemisinina ainda não foi totalmente elucidado, entretanto, acredita-se que também iniba o metabolismo do heme. Seu modo de ação pode estar relacionado à presença da ponte de peróxido, que em contato com o Fe^{2+} presente na hemoglobina sofre clivagem, formando um radical livre altamente reativo à membrana plasmática do vacúolo digestivo do parasita, causando sua morte (Figura 8) (YOUYOU, 2011).

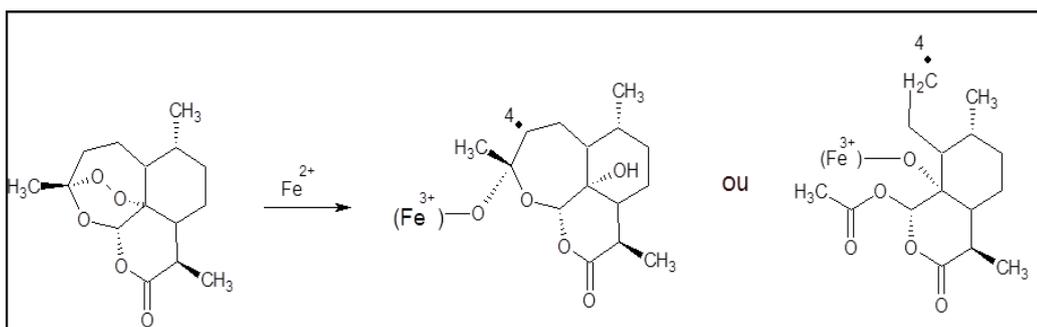


Figura 8. Mecanismo de ação da artemisinina. **Fonte:** YOUYOU, 2011.

2.5 O DESENVOLVIMENTO DE RESISTÊNCIA

A principal razão pela qual a malária não pôde ser erradicada até hoje tem sido a capacidade do parasita em desenvolver resistência a todos os quimioterápicos disponíveis atualmente. A própria ação farmacológica favorece o surgimento de cepas resistentes, segundo o princípio fundamental da evolução das espécies, na qual os indivíduos mais resistentes sobrevivem às ações do ambiente (WHO, 2011; HASTINGS, 2005).

Duas proteínas presentes na membrana do vacúolo digestivo do parasita estão diretamente relacionadas à resistência antimalárica, a proteína transportadora de resistência à cloroquina (cujá sigla em inglês é *PfCRT*), e a proteína transportadora de resistência à múltiplas drogas tipo 1, (*PfMDR1*) (MUHAMED *et. al*, 2013). A ação da *PfCRT* baseia-se em mutações nos genes que a expressam, conferindo à ela a capacidade de excretar cloroquina do

vacúolo digestivo do parasita (HYDE, 2007). A *PfMDR1* é uma glicoproteína ortóloga à proteínas de mamíferos que conferem a suas células tumorais a capacidade de resistência à múltiplas drogas. Essa proteína também está presente na membrana do vacúolo digestivo de parasitas resistentes, promovendo neles o influxo de diversos solutos para seu interior, diminuindo o espaço e conseqüentemente a concentração da droga antimalárica no vacúolo digestivo (WHITE, 2004).

A resistência aos medicamentos tem sido registrada com freqüência desde a década de setenta, quando gerações anteriores de antimaláricos, como a cloroquina e a sulfadoxina-pirimetamina, tiveram casos de ineficiência registrados em quase todas as regiões endêmicas de malária (TRAVASSOS & LAUPER, 2009).

Atualmente tem-se relatado o surgimento de resistência até mesmo à artemisinina em países da sub-região da Grande Mekong (Camboja, Mianmar, Tailândia e Vietnam). Nessas regiões a OMS preconiza a utilização de terapias combinadas à artemisinina, além da remoção gradativa das monoterapias do mercado, a fim de evitar que parasitas tornem-se resistentes à elas. Apesar dos esforços, na Península do Camboja tem-se relatado resistência a terapias combinadas à artemisinina e mesmo às monoterapias (WHO,2013).

No Brasil há relatos de resistência a diversos fármacos indicados para o tratamento da malária. Na Amazônia ocidental, em 1983, foram caracterizadas cepas de *P. falciparum* resistentes à cloroquina, amodiaquina e à sulfadoxina-pirimetamina. Atualmente, muitas cepas de *P. falciparum* isoladas na Amazônia brasileira apresentam mutações que lhes conferem resistência à cloroquina (FRANÇA, 2008).

2.6 A QUÍMICA DOS PRODUTOS NATURAIS

Frente à capacidade eminente de desenvolver resistência aos medicamentos antimaláricos dos parasitas causadores da malária, o estudo fitoquímico evidencia-se como alternativa proeminente na busca por novos compostos capazes de interromper a propagação da malária (WINK, 2012).

Através de um metabolismo diferenciado denominado de “metabolismo secundário”, as plantas sintetizam compostos com os quais interagem com o meio ambiente. Uma vez extraídos das plantas, esses metabólitos secundários constituem a matéria-prima de uma série de produtos, como corante, polímeros, fibras, colas, óleos, agentes aromatizantes, perfumes e drogas (KINGSTON, 2011). Seus compostos químicos apresentam uma infinidade de atividades biológicas já descritas na literatura científica, o que os tornam precursores de

medicamentos capazes de curar uma infinidade de doenças, assim como a quinina ou a artemisinina, que ainda hoje destacam-se no combate à malária (BUCHANAN *et. al.*, 2005). Segundo Hong (2011), as drogas de origem vegetal possuem características únicas como diversidade, afinidade de destino e especificidade fundamentais para o desenvolvimento de medicamentos.

Newman & Cragg (2012) têm realizado diversas revisões de literatura a respeito da produção e comercialização mundial de medicamentos. Em sua mais recente publicação, estima-se que nos últimos trinta anos cerca de 1355 medicamentos foram aprovados e comercializados, evidenciando uma expressiva participação dos produtos naturais como terapêuticos ou como precursores de novos medicamentos, correspondendo a aproximadamente vinte e sete por cento do número total medicamentos comercializados atualmente (Figura 9).

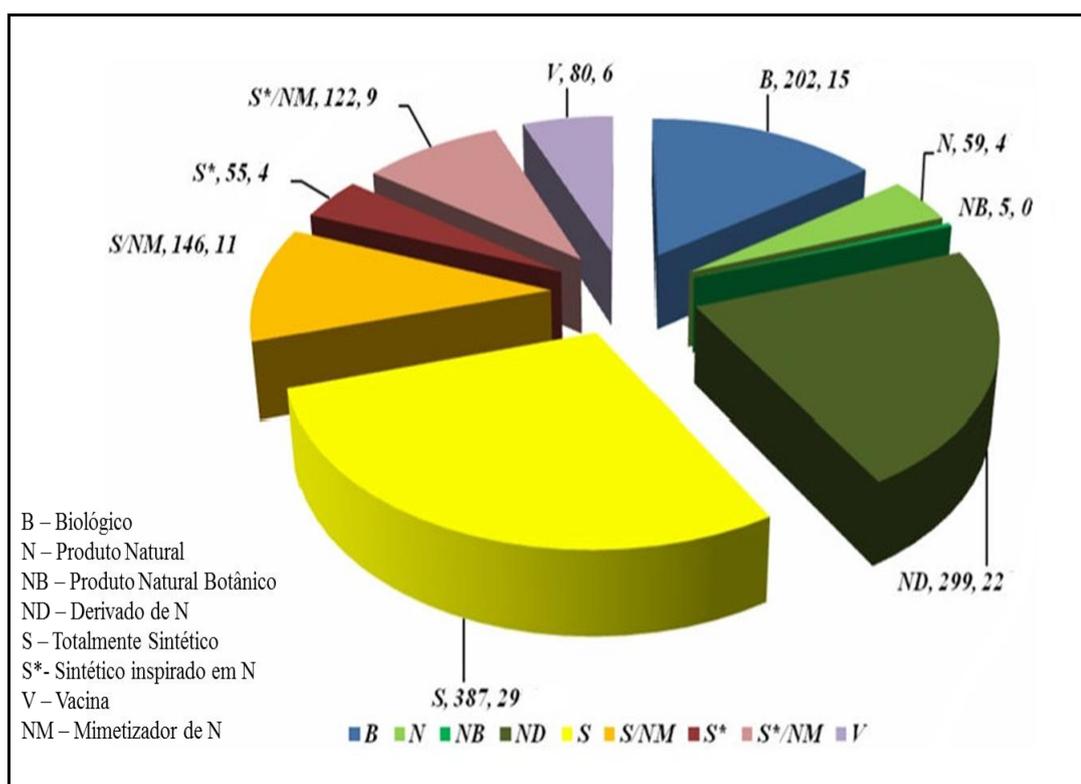


Figura 9. Medicamentos aprovados nos últimos 30 anos. **Fonte:** Adaptado de NEWMAN & CRAGG, 2012.

Apesar de significativa importância dos produtos de origem natural para a produção de novos medicamentos, o referido estudo chama a atenção para o alvo terapêutico desses medicamentos. De todas as 1355 drogas comercializadas durante esse período, apenas 14 são medicamentos destinados ao combate de doenças parasitárias, corroborando com afirmações

da OMS ao classificar doenças dessa natureza como “negligenciadas” (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

Concernente ao uso de plantas medicinais utilizadas no combate à malária, em 2004 foi realizada uma revisão bibliográfica na qual 1277 espécies vegetais foram descritas como terapia alternativa contra a malária (WILLCOX, 2011). Nesse contexto, a escolha de espécies vegetais como objeto de estudo na busca por novos agentes antimaláricos representa o foco de inúmeros laboratórios de química de produtos naturais ao redor do mundo, e principalmente pelo fato de que as principais drogas utilizadas no combate a malária foram extraídas de espécies vegetais (BOTSARIS, 2007).

2.7 ESPÉCIES AMAZÔNICAS

A biodiversidade representa o conjunto de seres vivos presentes na natureza e a particularidade de cada um deles representa um patrimônio genético de valor econômico inestimável. A respeito das plantas medicinais, o mercado fitoterápico movimenta cerca de US\$ 30 bilhões todos os anos (KINGSTON, 2011). O Brasil é país detentor da maior biodiversidade vegetal do planeta (20%), composta por aproximadamente 40.000 espécies, tornando promissor a busca por novos compostos naturais precursores de agentes antimaláricos (JOLY *et al.* 2011).

2.7.1 A família SIPARUNACEAE

De acordo com Ribeiro *et al.* (1999), a família Siparunaceae é representada pelos gêneros *Glossocalyx* Benth e *Siparuna* Aubl. No Brasil, essa família é composta predominantemente por espécies pertencentes ao gênero *Siparuna* Aubl. Esse gênero é formado por mais de 150 espécies, distribuídas entre as regiões tropicais e subtropicais do hemisfério sul (PHILIPSON, 1993; RENNER, 1997).

A principal característica das espécies dessa família é o forte odor exalado por quase todas as partes da planta, motivo pelo qual os nativos amazônicos a denominam de caá-pitiú (planta de cheiro ruim). Apresentam também folhas em formato simples ou elíptica, utilizadas no tratamento de disenteria. Suas madeiras são utilizadas na construção civil ou pela indústria de cosméticos, extraindo delas óleos essenciais (SILVA & SILVA, 2008; RIBEIRO *et al.*, 1999).

- O gênero *Siparuna*

O gênero *Siparuna* é formado por arbustos, arvoretas e árvores que podem chegar a medir 40 metros de altura, encontradas facilmente na Região Amazônica. Segundo Garrat (1934), a grande quantidade de óleos essenciais presentes nas espécies desse gênero lhes conferem agradável odor e valor medicinal. Uma espécie bastante utilizada pela cultura tradicional tem sido a *S. opiosyce*, conhecida popularmente como “limão-bravo”. De suas folhas são preparadas infusões, utilizadas contra males respiratórios e distúrbios intestinais (LEITÃO *et. al.*, 1999). Outra espécie, a *S. guianenses*, é utilizada por índios da tribo Tikuna como aliviador de dores estomacais. Índios da tribo Kubeo, localizados no alto Rio Negro, utilizam as folhas dessa mesma espécie contra picadas de cobra, ou ainda na forma de infusões como descongestionante nasal. Os Waorani, tribo equatoriana, maceram as folhas dessa espécie juntamente com outras ervas, preparando uma bebida utilizada para aliviar fortes dores de cabeça e febre (VALENTINE *et. al.*, 2010). Substâncias importantes como flavonoides, esteróis, lignanas e sesquiterpenos já foram extraídas de espécies desse gênero, comprovando sua eficácia contra males estomacais e respiratórios (LEITÃO *et. al.*, 1999).

Diversos alcaloides também já foram extraídos de espécies desse gênero. Leitão *et. al.* (1998) isolaram das espécies *S. opiosyce* e *S. anrianeae* alcaloides oxoaporfínicos, além de revisar outros trabalhos nos quais foram isolados alcaloides benzoquinolínicos de outras espécies desse mesmo gênero. Em um estudo sobre o potencial antiparasitário de espécies brasileiras, o extrato etanólico da espécie *S. guianensis* apresentou 100 % de letalidade contra cultura *in vitro* de leishmaniose à 100 µg/ml, além de nenhum efeito citotóxico às células, indicando-a como espécie como produtora de compostos antiparasitários em potencial (TEMPONE *et al.*, 2005).

- *Siparuna glycyarpa*

Há poucos estudos a respeito da constituição química da espécie *S. glycyarpa*. Costa *et. al.* (2013) isolaram do extrato de acetato de etila das folhas dessa espécie alguns flavonoides e outros compostos aromáticos, tais como quercetina, campferol e muitos outros com comprovada atividade biológica. O presente trabalho relata pela primeira vez a ação antimalárica e o perfil fitoquímico da referida espécie.

2.7.2 A família ANNONACEAE

A família Annonaceae pertence à ordem Magnoliales e possui ampla distribuição de espécies na Região Amazônica e em áreas da Mata Atlântica. Essa família compreende aproximadamente 135 gêneros e aproximadamente 2500 espécies, distribuídas entre as Américas do Sul, América Central, África, Ásia e Austrália. No Brasil, podem ser encontrados 26 gêneros e 265 espécies (DI STASE & HIRUMA-LIMA, 2002; MAAS *et. al.*, 2007; CHATROU *et. al.*, 2009).

Em geral, as espécies dessa família apresentam características de arvoretas e podem ser identificadas pelo forte odor exalado na secção de seus troncos ou ramos, ou ainda pela presença de longas fibras dísticas e folhas espiraladas (JOLY, 1993). São conhecidas popularmente pela comercialização de seus frutos e derivados, principalmente os do gênero *Annona*, como a graviola (*A. muricata* L.) e a fruta do conde (*A. squamosa* L.). Na indústria, servem como matéria-prima para a produção de medicamentos e para produção de perfumes e cosméticos a partir de seus óleos essenciais (PIO CORRÊA, 1984; COUVREUR *et. al.*, 2011).

Em um estudo realizado em Camarões, 21 espécies do gênero *Annona* foram mencionadas como terapêuticos alternativos contra a malária (TSABANG *et. al.*, 2012). Em outro estudo, 118 extratos provenientes de espécies pertencentes à família Annonaceae foram avaliados contra cepas de *P. falciparum*. Desses, trinta e sete apresentaram atividade significativa frente o parasita *P. falciparum*, com IC₅₀ entre 1,07 e 9,03 µg/mL (BOYOM, 2011).

- Gênero *Bocageopsis*

O gênero *Bocageopsis* é composto pelas espécies *B. canercens*, *B. mattogrossensis*, *B. multiflora* e *B. pleiosperma*, encontradas geralmente em florestas não inundadas e raramente em savanas, na região norte da América do Sul (MASS *et. al.*, 2007).

- *Bocageopsis multiflora*

B. multiflora é uma espécie arbórea, com altura entre 7 e 27 metros. Pode ser encontrada em algumas regiões da Amazônia boliviana, na Colômbia, Venezuela, Guiana, Suriname e Brasil, no estado do Amazonas, onde é conhecida popularmente como Ata-meju, Envira, Envira preta, Envira-surucucú, Envireira, Envireira-preta, Gabiroba, Invira-surucucu,

Invireiro-surucucu e Morteira (MASS *et. al.*, 2007).Oliveira *et. al.* (2013) apresentaram o primeiro estudo do perfil fitoquímico dos óleos essenciais das folhas dessa espécie, coletadas na Reserva Florestal Adolpho Ducke, em Manaus, os quais apresentaram atividade significativa contra formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, protrombina e atividade parcial para tromboplastina. O presente trabalho realiza pela primeira vez investigação a respeito da atividade antimalárica presente nas folhas e cascas dessa espécie, além de seus respectivos perfis fitoquímicos.

- *Bocageopsis pleiosperma*

B. pleiosperma é uma espécie arbórea que pode medir de 8 à 28 metros de altura, com tronco de 45 cm de diâmetro. Ocorre em toda Região Amazônica, principalmente em floresta primária. Floresce de fevereiro a novembro, e é usada para reflorestamento e para fins ornamentais, sendo conhecida popularmente como como envira-preta, envira-ferro e envira-surucucu. Essa última denominação é devida ao uso popular de seus óleos no tratamento de picadas de cobra (MASS *et. al.*, 2007). Ainda não foram publicados trabalhos científicos a respeito da constituição química dessa espécie, sendo o presente trabalho o primeiro a investigar em suas folhas e cascas a presença de atividade antimalárica.

3 JUSTIFICATIVA

Apesar de causar a morte de milhares de pessoas todos os anos, as medidas adotadas atualmente pela OMS a fim de conter o avanço da malária não têm sido suficientes para confrontar a emergente resistência dos parasitas aos medicamentos antimaláricos disponíveis no mercado atualmente. Aliada à inexistência de uma vacina e à dificuldade em controlar a distribuição dos mosquitos vetores, a malária continua sendo uma das doenças de maior incidência e prevalência da história da humanidade, e ainda assim constitui o quadro das “doenças negligenciadas” (WHO, 2010). Dos 1355 novos medicamentos introduzidas no mercado nos últimos 30 anos, apenas 14 foram destinadas ao combate de doenças tropicais (NEWMAN & CRAGG (2012). No ano 2000, apenas 0,1% dos investimentos foram voltados para o desenvolvimento de medicamentos e estratégias para o controle de doenças parasitárias e para, que juntas, correspondem à 5% dos problemas de saúde no mundo (PINK *et. al.*, 2005).

Focos de resistência à artemisinina, medicamento antimalárico mais eficaz disponível atualmente, têm surgido em regiões da Ásia, indicando que em um prazo de 10 anos a principal terapia antimalárica tornar-se-á obsoleta. Além disso, tal fato evidencia a capacidade do parasita em desenvolver resistência a qualquer medicamento administrado sobre ele durante determinado tempo, tornando a busca por novas substâncias antimaláricas uma constante (WHO, 2010).

Partindo do pressuposto que as mais eficazes substâncias antimaláricas foram isolados de espécies vegetais, a busca por novos agentes antimaláricos em espécies vegetais da flora amazônica constitui um objeto de investigação. Por isso, o presente trabalho propõe a busca por agentes antimaláricos em três espécies vegetais da Região Amazônica: *Siparuna glycyarpa*, *Bocageopsis multiflora* e *B. pleiosperma*.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar química e biologicamente extratos e frações obtidos a partir de espécies vegetais da flora Amazônica como agentes antimaláricos.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Selecionar espécies vegetais com relato de uso como antimalárico na medicina popular da região amazônica ou em banco de dados conhecidos.
- Avaliar a atividade antimalárica de extratos e frações obtidas das espécies selecionadas através de ensaios biológicos *in vitro*.
- Avaliar o mecanismo de ação antimalárica através dos ensaios de inibição de formação de β -hematina e ensaio de inibição da enzima HGRPTase.
- Avaliar as classes químicas dos extratos e frações por cromatografia em camada delgada (CCD).
- Avaliar o perfil cromatográfico dos extratos e frações apolares por cromatografia gasosa acoplada ao espectro de massas (CG-EM).
- Avaliar o perfil cromatográfico dos extratos e frações polares por cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE-DAD-EM)

5 METODOLOGIA

5.1 MATERIAL BOTÂNICO

As espécies vegetais *B. multiflora*, *B. pleiosperma* e *S. glycyarpa* foram coletadas na Reserva Florestal Adolpho Ducke, localizada no Km 26 da rodovia AM-010. Folhas e cascas das espécies selecionadas foram coletadas de árvores catalogadas, cujas exsiccatas foram comparadas com exemplares depositados no herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) conforme descrito na tabela 1.

Tabela 1. Numeração das exsiccatas - Herbário INPA.

Espécies	Nº da Exsicata
<i>B. multiflora</i>	179005-18,10,1994
<i>B. pleiosperma</i>	191483-04,09,1997
<i>S. glycyarpa</i>	184059-02,02,1996

5.2 OBTENÇÃO DE EXTRATOS E FRAÇÕES

As plantas selecionadas foram secas em estufa de ar circulante a 45°C durante 48 horas. Em seguida, o material foi pulverizado em moinho de facas e submetido à extração por maceração com solventes de crescente polaridade, conforme ilustrado na figura 10.

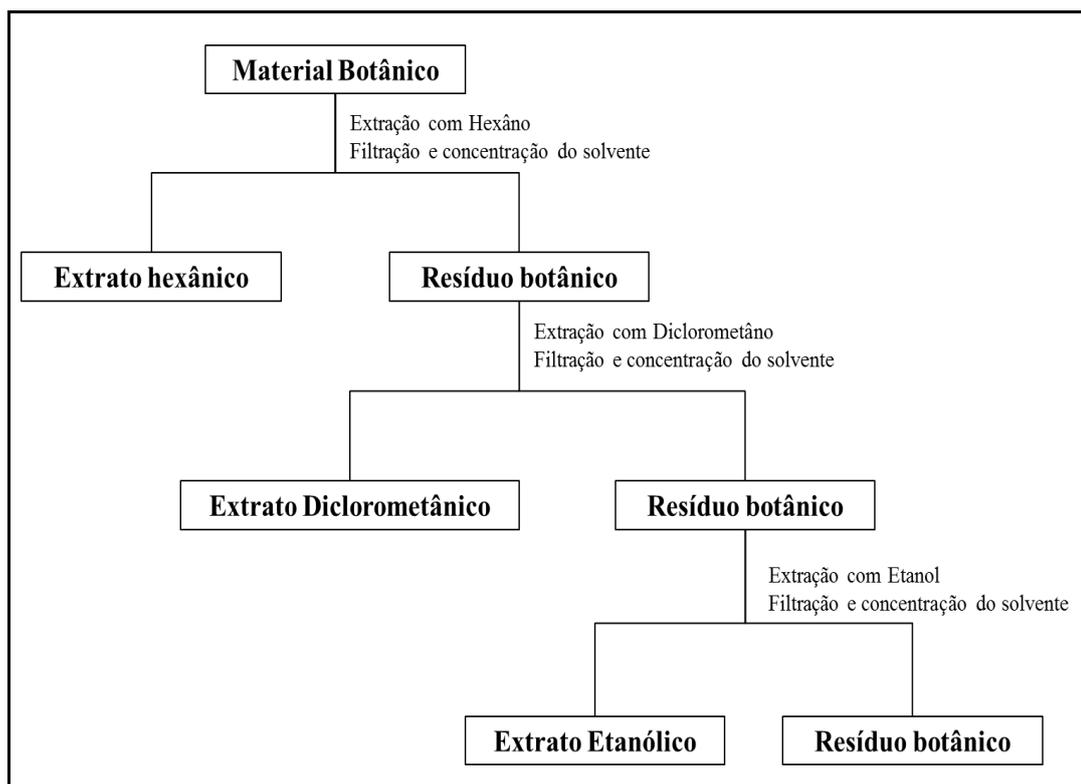


Figura 10. Obtenção dos extratos. **Fonte:** Elaborado pelo autor.

Foram utilizados 1,178 kg de folhas e 200g de cascas da espécie *B. multiflora*. Das demais espécies foram utilizados 200g de cascas e folhas para a obtenção dos extratos. A tabela 2 exibe o rendimento obtido de cada espécie.

Tabela 2: Rendimento dos extratos obtidos por maceração.

Espécies	Rendimento (%)		
	Extrato Hex	Extrato DCM	Extrato EtOH
<i>B. multiflora</i>	1,72(f)	2,81 (f)	2,81 (f)
	0,15(c)	0,11(c)	-
<i>B. pleiosperma</i>	4,46 (f)	1,12 (f)	-
	0,63 (c)	0,5 (c)	-
<i>S. glycyarpa</i>	3,54(f)	1,07(f)	-
	ND	0,8(c)	-

f: folhas;c: cascas;Hex: hexano; DCM: diclorometano;EtOH: etanol.ND: Não disponível.

5.3 ENSAIOS BIOLÓGICOS

5.3.1 Avaliação da atividade inibitória frente *P. falciparum* (3D7 eW2)

- Cultura de *Plasmodium falciparum*

O desenvolvimento das etapas de cultivo, manejo e inibição de cepas de *P. falciparum* foram realizadas no Laboratório de Imunofarmacologia da Fundação Oswaldo Cruz no Rio de Janeiro, sob a supervisão do Dr.º Hugo Caire de Castro Faria Neto.

Eritrócitos previamente obtidos a partir da centrifugação de sangue humano foram mantidos em garrafas de cultura, juntamente com o meio de cultivo RPMI incompleto e dez por cento de soro humano AB+. A garrafa foi incubada à 37°C, adiciona-se à ela uma mistura padrão de gases (5,2% de CO₂, 5% de O₂ e nitrogênio). Essa metodologia é uma adaptação do método “*candle jars*”, proposto por Trager & Jansen (1976).

Com o sangue parasitado foram realizados esfregaços em lâminas de vidro, coradas com o kit Panótico Rápido® (RenyLab®), sendo dessa maneira possível monitorar o crescimento parasitário em microscópio óptico. O hematócrito (quantidade de hemácias em relação ao meio em volume) foi mantido a uma concentração de cinco por cento. Novas hemácias foram adicionadas à garrafa a cada dois dias.

- Ensaio de inibição de crescimento

Primeiramente foram preparadas soluções-estoque dos extratos obtidos, solubilizando-os em dimetilsulfóxido (DMSO) a uma concentração de 30mg/mL. Concentrações de 100 à 6,25 µg/ml dessa solução foram distribuídas em triplicatas de 100 µl cada, em uma placa de 96 poços. Em seguida, foi preparada uma solução sanguínea com o sangue parasitado contido nas garrafas de cultivo, diluindo-o em meio de cultura até apresentar hematócrito de 2 % (número de hemácias em relação ao volume do meio) e parasitemia de 0,5% (nº de células parasitadas em relação ao nº total de células), mimetizando o ambiente orgânico infectado do hospedeiro (Figura 11).

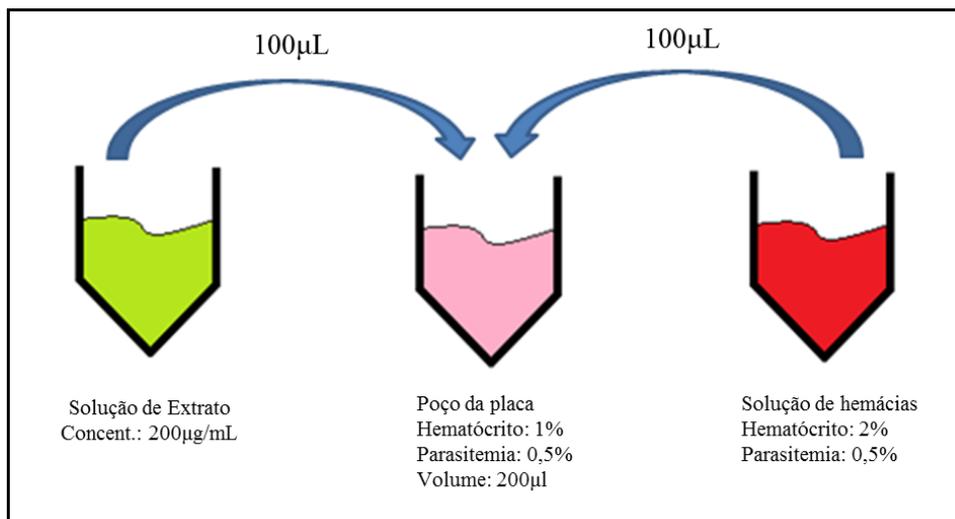


Figura 11. Ensaio antimalárico. **Fonte:** Elaborado pelo autor.

Também foram preparados o controle-branco com hemácias não parasitadas e sem extratos ou DMSO (HNP), controles-negativos, formados por hemácias parasitadas em meio de cultivo sem DMSO (HP) e hemácias parasitadas com DMSO (DMSO), todos em triplicata. A comparação entre eles permitiu avaliar possível interferência do solvente no crescimento parasitário (Figura 12).

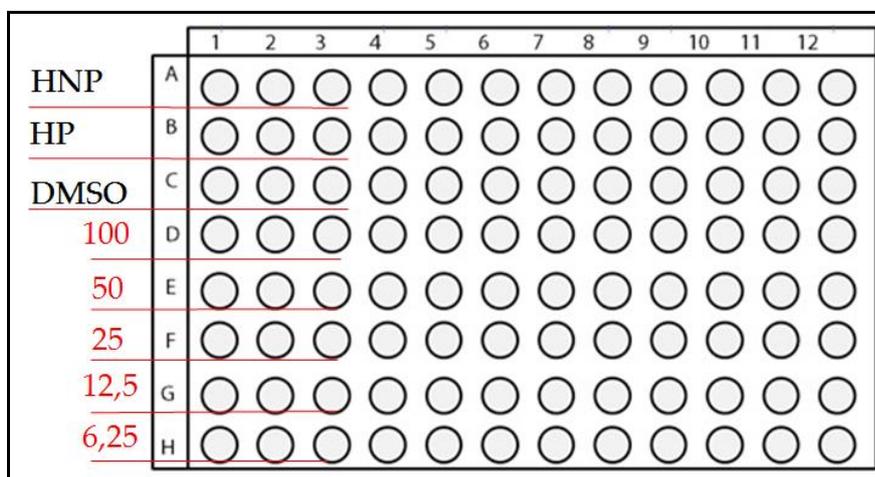


Figura 12. Disposição das amostras. **Fonte:** Elaborado pelo autor.

O controle positivo foi realizado separadamente com cloroquina para avaliação da letalidade de cepas 3D7, em concentrações diluídas de 100µg/mL à 0,0001µg/mL em diluições de 1:10. O valor de IC₅₀ gerado por essa avaliação foi de 0,52µg/mL, valor semelhante ao encontrado na literatura para inibição de cepas 3D7. Para avaliação da

letalidade de cepas W2 foi utilizado como controle positivo o composto mefloquina, nas mesmas concentrações do composto cloroquina. O IC_{50} encontrado para inibição desse composto nesse experimento foi de $0,86\mu\text{g/mL}$, igualmente eficiente quando comparado a dados da literatura (AMARANTE *et. al.*, 2012).

- Avaliação da inibição do crescimento parasitário por fluorescência.

O teste de atividade antimalárica mensura a capacidade do extrato em causar a morte do parasita causador da malária. Após 48h de incubação, o sobrenadante de cada triplicata foi retirado dos poços, deixando somente o precipitado de hemácias, suspenso em tampão de lise de eritrócitos. Essa avaliação foi realizada através da intensidade de fluorescência emitida por cada poço em espectrofotômetro com o auxílio do corante de bases nitrogenadas SyBr Green. Assim sendo, quanto maior a fluorescência detectada pelo espectrofotômetro, medida por unidades de fluorescência (RFU), maior é a quantidade de DNA presente no poço e conseqüentemente maior a quantidade de parasitas, uma vez que as hemácias não possuem núcleo. As análises foram realizadas a partir dos valores numéricos gerados por espectrofotômetro de fluorescência, ao incidir ondas de excitação de 485 nm, emissão em 535 nm e *cutoff* de 530 nm, correspondentes às unidades relativas de fluorescência.

- Análise estatística

As análises estatísticas realizadas para determinação do IC_{50} dos extratos avaliados durante esse ensaio foram realizadas pelo Laboratório de Estatística (LabEst), coordenado pelo Professor Dr.º James Dean Oliveira dos Santos Júnior, na Universidade Federal do Amazonas.

Em um estudo fitoquímico realizado por AMARANTE *et. al.* (2011), concentrações de cloroquina foram avaliadas nas mesmas concentrações dos extratos avaliados neste experimento. A média inibitória de seus valores foi o parâmetro utilizado para determinar a eficiência inibitória dos extratos avaliados nesse trabalho. Estabeleceu-se que a atividade antimalárica de um extrato é considerada nula quando o valor de seu IC_{50} é superior ou igual à $100\mu\text{g/mL}$, baixa quando encontra-se entre $100-50\mu\text{g/mL}$, moderada entre $50-10\mu\text{g/mL}$, e alta quando abaixo de $10\mu\text{g/mL}$.

A análise estatística buscou encontrar nos modelos matemáticos de curva ajustada

Gaussiana, Log-logística e Weibull do tipo I e II a melhor forma de expressar a inibição parasitária promovida pelos extratos avaliados.

Foram utilizadas duas medidas de ajuste: o Critério de Informação de Akaike (AIC), que mede o quão verossímil é o ajuste penalizado com o número de parâmetros necessários para ajustá-lo, e o ajuste da curva contra a análise de variância com um fator (ANOVA), que testa hipóteses, gerando o p-valor.

Para cada tipo de fração, foram ajustadas as seguintes curvas: Gaussian, BC.5, W1.3, W2.4, LL.3, CRS.5c, W2.3. Foi utilizado o método dos mínimos quadrados generalizados considerando variâncias constantes. Alguns ajustes apresentaram evidências de variâncias não constantes, contudo, isto não produziu mudanças marcantes nas estimativas das curvas e cálculo do IC₅₀. Todas as análises foram feitas utilizando o pacote *drm*, do *software R*.

5.3.2 Avaliação da atividade inibitória da formação de β -hematina

Para sintetizar proteínas o parasita da malária requer aminoácidos, extraídos da hemoglobina presente nos eritrócitos. Contudo, a digestão da hemoglobina também libera a Fe(III)PPIX, responsável pelo transporte do oxigênio, causando lesões nas membranas vacuolares do parasita (BARROS, 1992; LIMA & ABDALLA, 2001). Assim sendo, o parasita desenvolveu estratégias que viabilizaram sua sobrevivência nesse microambiente, e embora quatro possíveis mecanismos tenham sido propostos para tal, o mais aceito é formação da hemozoína ou “pigmento malárico”. Análises espectroscópicas e cristalográficas indicam que a hemozoína é estruturalmente análoga β -hematina, formada pela polimerização de hemina bovina (SILVA *et. al.*, 2005).

Para a realização desses ensaios foram utilizados como solvente dos extratos o DMSO, como controle positivo foi utilizado fosfato de cloroquina, além de ácido acético glacial e acetato de sódio. Foram preparadas três soluções: solução de cloreto de hemina à 0,5 mg/mL dissolvida em DMSO; tampão acetato de sódio à 0.5M; solução dos extratos à 1 mg/mL.

Foram pipetados 50 μ L de cloreto de hemina, 100 μ L de acetato de sódio e 50 μ L de cloroquina a 0,1 mg/mL, exatamente nessa ordem. Em seguida, a placa passou por um período de incubação de 24 horas a 37°C. Após esse período, a placa foi centrifugada à 4000 RPM, precipitando a β -hematina formada pela reação da mistura anterior. O sobrenadante foi retirado, e sobre o precipitado foram adicionados 200 μ L de DMSO a fim de remover os monômeros de hemina que não se ligaram.

Novamente a placa foi centrifugada (4000 RPM), descartando-se o DMSO com hemina livre. Finalmente foram adicionados sobre o precipitado 200µl de NaOH, formando um complexo refratário detectável ao espectrofotômetro.

Os resultados foram expressos através de diagramas em coluna, os quais representam a eficácia dos compostos analisados quanto à inibição da formação do composto β-hematina. A absorvância é inversamente proporcional à eficácia antimalárica dos compostos, logo, quanto menor a absorvância, maior a eficiência inibitória.

5.3.3 Avaliação da capacidade inibitória de HGRPTase

A ligação entre os extratos obtidos e a enzima HGRPTase foi avaliada pela técnica de ressonância nuclear plasmônica, utilizando o equipamento Biacore (GE, Healthcare). A proteína purificada foi imobilizada em uma das células de fluxo em fichas independentes, utilizando o kit de acoplamento amina, de acordo com o protocolo do fabricante. A segunda célula foi utilizada como padrão de referência para as mudanças nos índices de refração durante o experimento.

As concentrações dos extratos foram feitas a partir de uma solução estoque de 200mg/mL em etanol. Em seguida, 100µl dessa solução foi diluída em 900 µL de etanol, atingindo a concentração de 20mg/mL. Dessa solução, foram retirados 2µL, diluídos em 180µL de PBS, resultando numa solução de concentração final de 200µg/mL.

O sistema Biacore foi condicionado em tampão HEPES 10 mM (pH 5,0), KCl à 150 mM, EDTA à 3 mM e 0,005% de tensoativo P20. Seis mil unidades de resposta de imobilização (UR) foram obtidos ao passar sobre a célula referência injeções com 30µl da substância padrão de detecção, à 100µg/ml, em 10 mM de acetato de etila (pH 5,0).

O teste de ligação foi realizado utilizando-se um grama de concentração de ligando postos em contato ao longo da superfície do chip, em fluxo contínuo de 5µl/min a partir de injeções com 40µl cada. A constante de dissociação foi obtida ajustando as respostas em 1:1 no modelo de regressão linear (BioEvaluation 4.1).

5.3.4 Avaliação da capacidade hemolítica

A quantificação da atividade hemolítica dos extratos foi realizada utilizando placas de Ágar Sangue (AS)5% v/v. A solução de hemácias foi preparada a partir de 4 ml de sangue

venoso humano, centrifugado à 2500 rpm por 10 minutos e posteriormente misturado à solução ágar. Soluções dos extratos avaliados foram preparadas, solubilizando-os em DMSO em concentrações de 500 µg/ml e 250 µg/ml. Posteriormente, 20 µl dessas soluções foram semeadas nas placas AS. Como controle negativo foram utilizados 20 µl de DMSO, e como controle positivo, uma solução saponínica à 1mg/ml, também em 20 µl.

As placas foram incubadas a 35°C durante 24 horas, e após esse período, os halos de inibição formados pela lise hemolítica foram medidos em milímetros (YIGIT& AKTAS,2009). Esse ensaio foi realizado no Instituto Leônidas e Maria Deane - FioCruz-AM.

5.4 ANÁLISES QUÍMICAS

5.4.1 Avaliação do perfil cromatográfico em Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

As análises por cromatografia em camada delgada foram realizadas em placas cromatográficas da marca Merck, sílica gel 60, com indicador de fluorescência F254, com suporte em alumínio e 0,2mm de espessura, reveladas como reveladores químicos específicos.

5.4.2 Fracionamento por Cromatografia em coluna

Os fracionamentos cromatográficos foram realizados em coluna de vidro, de altura e diâmetro específicos de acordo com a quantidade de massa utilizada em cada fracionamento. As fases estacionárias também foram escolhidas de acordo com o material a ser cromatografado, conforme as seguintes especificações: Sílica gel 60 com partículas entre 0,063-0,200mm (70-230 mesh ASTM) (Merck) e Sephadex LH-20.

5.4.3 Avaliação do perfil cromatográfico por Cromatografia em Fase Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM)

As análises foram realizadas por Cromatografia em fase gasosa acoplada à Espectrômetro de Massas (CG-EM). O equipamento utilizando-se foi um CG HP 6890 com interface HP 5873, detector de massas seletivo (energia de detecção 70eV), equipado com um DB-5MS, coluna capilar (30 m x espessura de 0,25 mm, espessura de filme 0,25 µm), usando hélio como gás de arraste (1,0 mL min⁻¹). As temperaturas do injetor e detector foram de 230°C e 280°C, respectivamente.

A identificação dos componentes foram baseadas na comparação entre os índices de retenção e o padrão de fragmentação observado no espectro de massas. Tais informações foram comparadas a dados literários (ADAMS, 2007) e software do equipamento, a biblioteca Wiley275.

5.4.4 Avaliação do perfil cromatográfico por Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplado ao Espectro de Massas –CLUE-DAD-EM

As análises de CLAE-EM foram em parceria com a FIOCRUZ-RJ (FARMANGUINHOS). Foi utilizado o cromatógrafo UFLC Shimadzu modelo NEXERA equipado com injetor automático e acoplado a um espectrômetro de massa Bruker. Foi utilizada uma coluna analítica em fase reversa ShimPack C-18 100 x 2 x 2,2µm, tendo como fase móvel Ácido Fórmico 0,1% / ACN + 0,1% ácido combinados em sistemas de eluentes. Os solventes, metanol ou acetonitrila, utilizados nas diversas análises por CLUE foram de grau CLAE/UV – Tedia. A água foi obtida por destilação em sistema Milli-Q. Todos os solventes de grau HPLC foram filtrados em filtro 0,45 µm da Millipore antes da utilização.

O espectrômetro de massas foi ajustado para os seguintes parâmetros de operação: temperatura do gás de secagem a 200° C, fluxo de 4 mL/ mim, nitrogênio como gás nebulizador à pressão de 0,4 Bar e voltagem do capilar de 4500 V. As análises foram realizadas no modo negativo e a aquisição do espectro foi realizada no modo *full scan* de 0 a 1200 Da.

6 RESULTADOS

CAPÍTULO 1: ENSAIOS BIOLÓGICOS

6.1. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INIBITÓRIA DE *P. falciparum*(3D7 E W2)

6.1.1 Inibição parasitária pelo extrato hexano das folhas de *B. multiflora* - EHFBM

Após a leitura em microplaca, foi possível notar uma considerável diminuição no número de cepas resistentes (W2) e sensíveis (3D7) à cloroquina na presença do EHFBM. Os valores gerados pela fluorescência desse ensaio foram avaliados estatisticamente, determinando assim os valores de IC₅₀ desse extrato em 52,521µg/mL para cepas 3D7 e 57,166 para cepas W2(Figura 13). Extratos com IC₅₀com valor entre 10µg/mL e 100µg/mL são considerados moderadamente ativos contra *P. falciparum*(ver página 60) (AMARANTE *et. al.*, 2011).

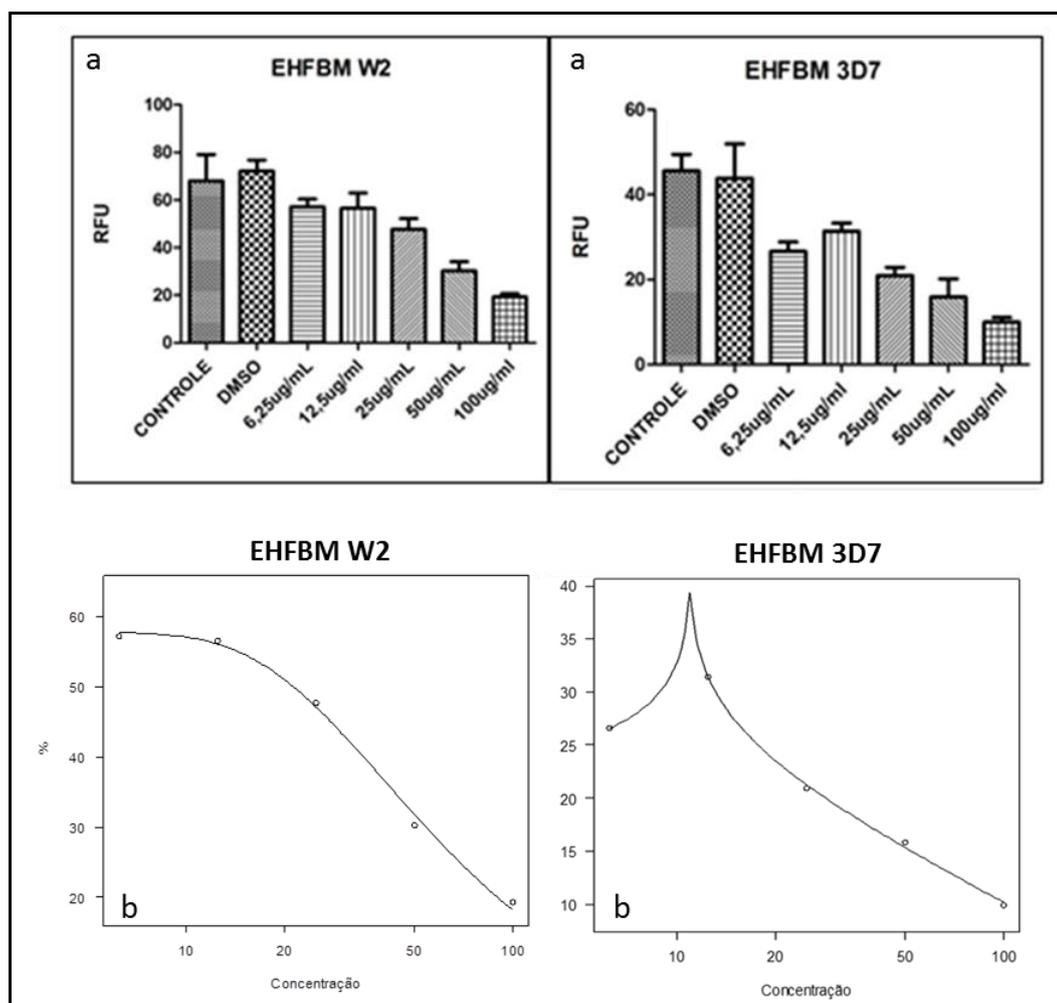


Figura 13. Gráfico de fluorescência do extrato (a); Curva de concentração inibitória (b). **Fonte:** Elaborado pelo autor.

6.1.2 Inibição parasitária pelo extrato diclorometano das folhas de *B. multiflora*– EDFBM

O extrato EDFBM mostrou ser capaz de inibir cepas sensíveis e resistentes à cloroquina em todas as concentrações em que foi avaliado, até concentrações de 6,25µg/mL. Apesar disso, a determinação do IC₅₀ desse extrato não foi possível uma vez que os valores numéricos apresentados pela análise espectrométrica se anulam ao invés de seguirem uma tendência de ascendência ou declínio de inibição do crescimento parasitária. Em outras palavras, a inibição aumenta na medida em que a concentração diminui até 25µg/mL, e a partir daí, perde um pouco a eficácia de inibição apesar de permanecer elevada (Figura 14).

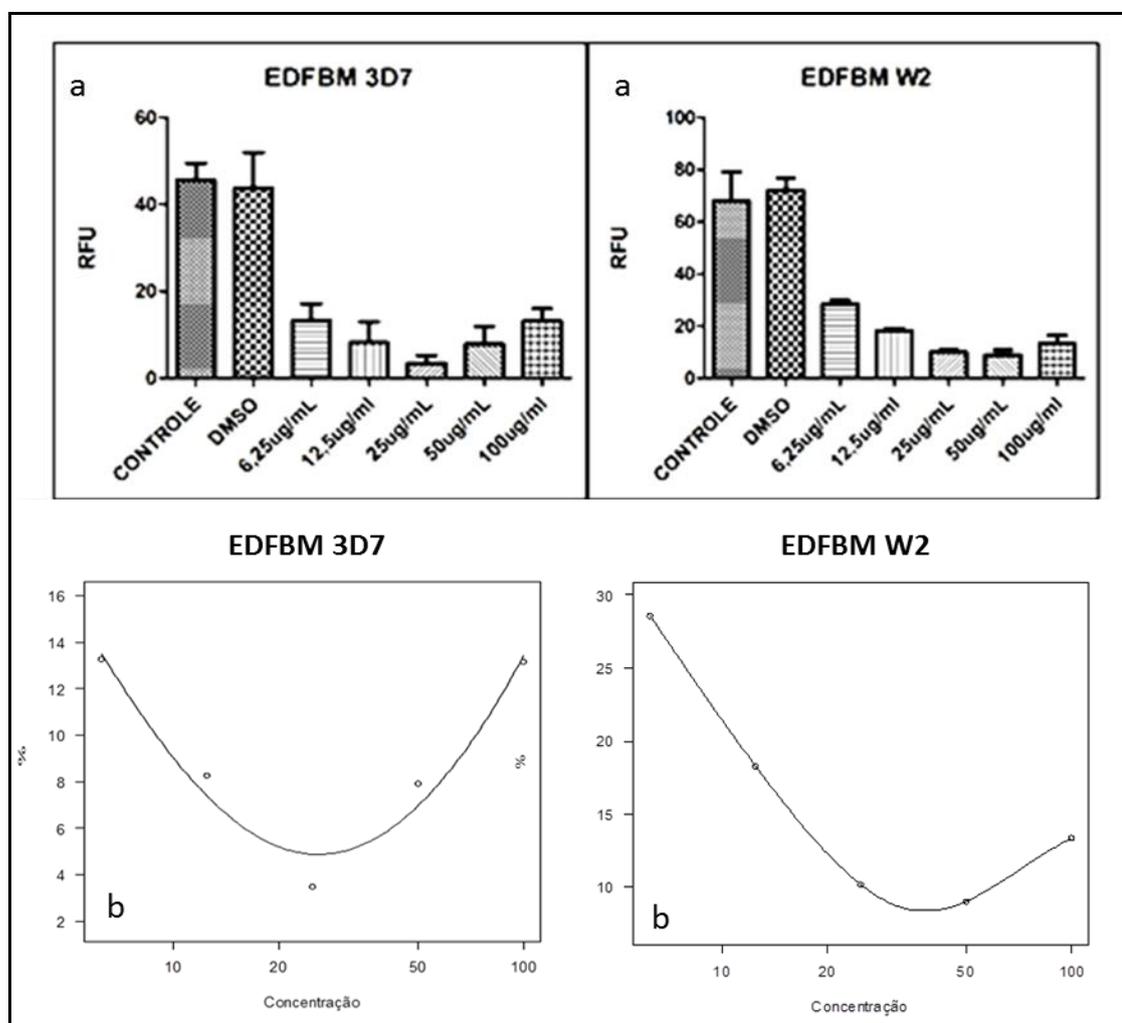


Figura 14. Gráfico de fluorescência do extrato (a); Curva de concentração inibitória (b). **Fonte:** Elaborado pelo autor.

É importante ressaltar que o experimento foi repetido três vezes, e cada repetição em triplicata. O comportamento foi observado em cada um dos poços contendo esse extrato, e o resultado expresso no gráfico com a média de cada um deles.

6.1.3 Inibição parasitária pelo extrato etanólico das folhas de *B. multiflora*- EEFBM

A figura 15 exibe os gráficos de inibição parasitária causados pelo extrato EEFBM. Neles é possível notar que, apesar de eficiente em inibir a crescimento parasitário em concentrações de 100µg/mL, nas demais concentrações essa atividade diminui até tornar-se praticamente nula. Em cepas 3D7 o valor de IC₅₀ foi estimado em 46,985µg/mL, enquanto que em cepas resistentes (W2) esse valor ficou em 44,998 µg/mL, portanto, tal extrato é considerado possuidor de moderada atividade antimalárica.

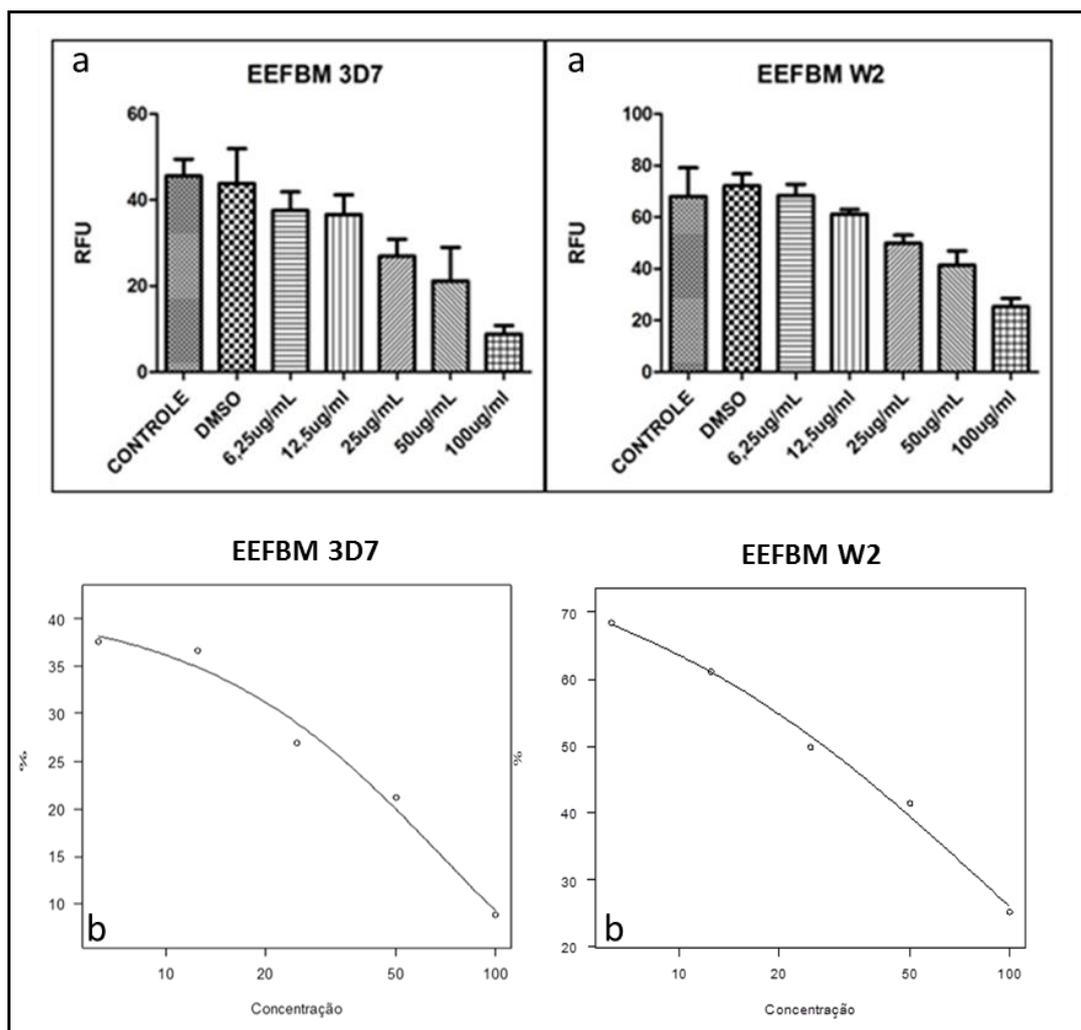


Figura 15. Gráfico de fluorescência do extrato (a); Curva de concentração inibitória (b). **Fonte:** Elaborado pelo autor.

6.1.4 Inibição parasitária pelo extrato diclorometano das folhas de *B. multiflora* - EDFBP

Em relação ao extrato EDFBM o extrato EDFBP apresentou menor eficiência, evidenciando diferenças biológicas entre as espécies desse gênero. Assim como em EEFBM, o extrato EDFBP apresenta considerada inibição parasitária na concentração de 100 µg/mL, perdendo essa eficácia nas demais concentrações. O IC₅₀ desse extrato foi avaliado em 47,842 µg/mL para inibição de cepas sensíveis (3D7) e 71,037 µg/mL para inibição de cepas resistentes (W2) (Figura 16).

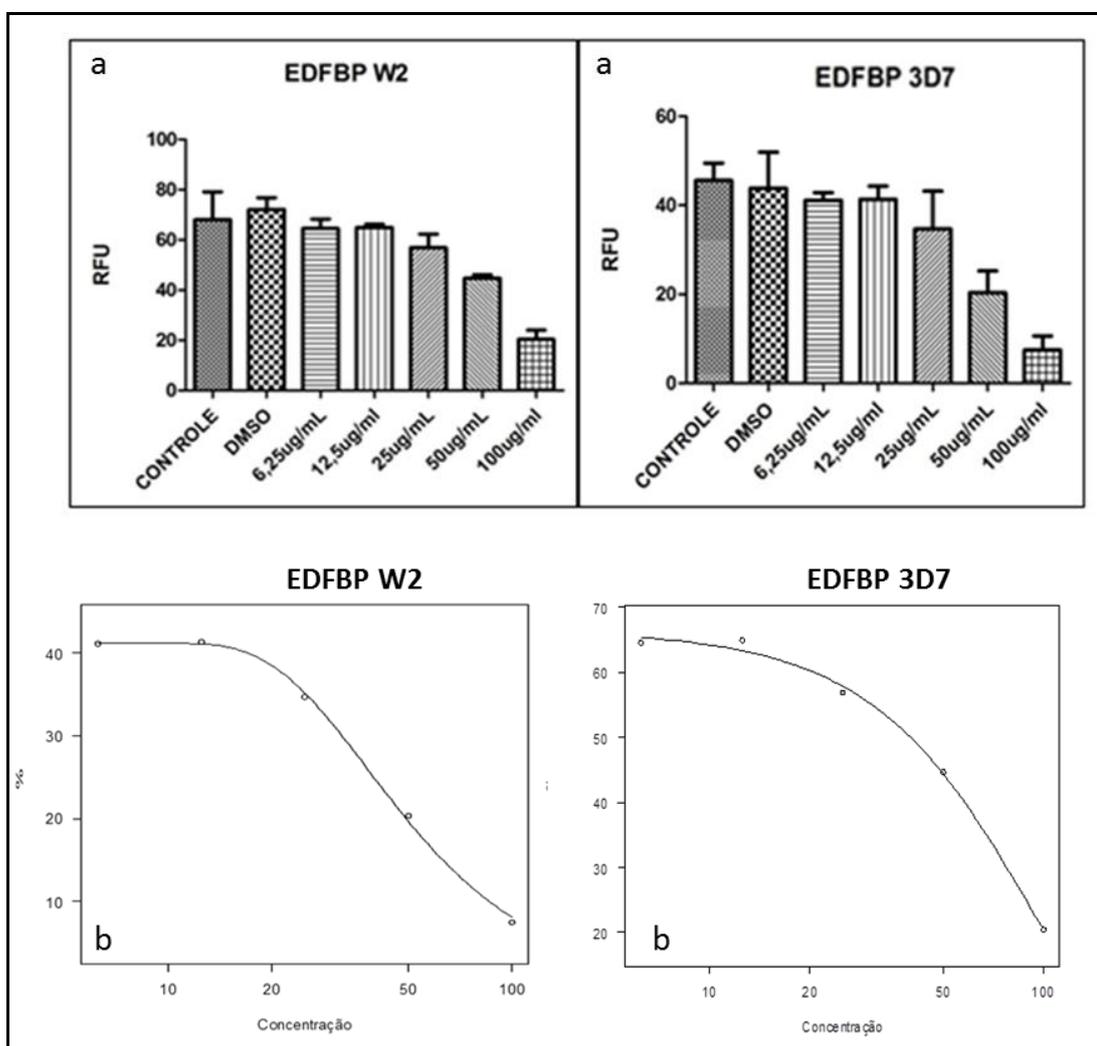


Figura 16. Gráfico de fluorescência do extrato (a); Curva de concentração inibitória (b). **Fonte:** Elaborado pelo autor.

6.1.5 Inibição parasitária pelo extrato Diclorometano das Cascas de *B. pleiosperma* - EDCBP

Dos extratos avaliados durante esse estudo, o EDCBP foi o que apresentou eficiência na inibição parasitária *in vitro*, mostrando-se inibidor mesmo em concentrações de 25µg/mL e em ambas as cepas. O IC₅₀ desse extrato foi avaliado em 14,394µg/mL para 3D7 e em 12,172 µg/mL para cepas W2, o que os classifica como extrato de moderada atividade antimalárica (Figura 17).

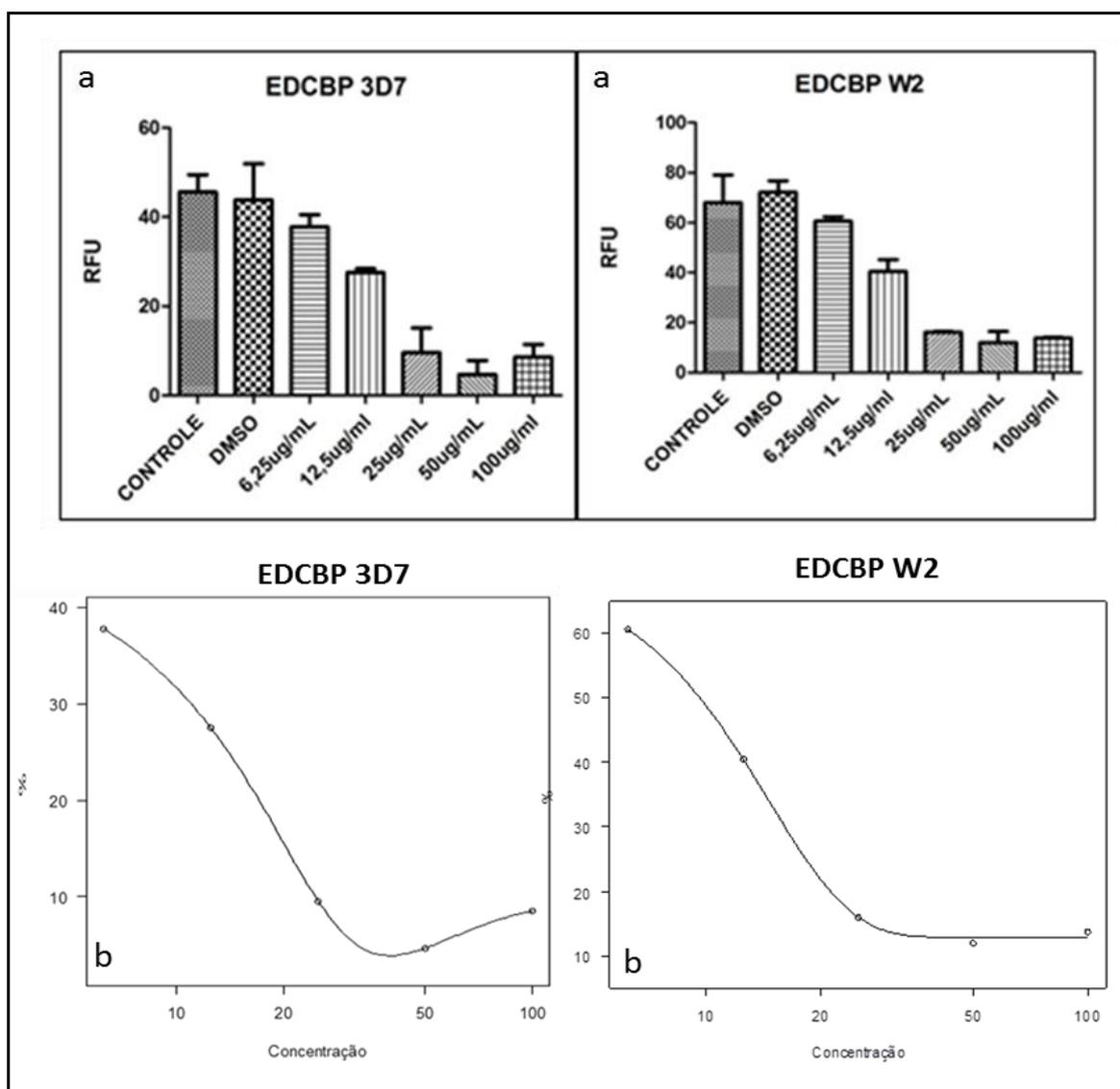


Figura 17. Gráfico de fluorescência do extrato (a); Curva de concentração inibitória (b).
Fonte: Elaborado pelo autor.

6.1.6 Inibição parasitária pelo extrato diclorometano das folhas de *S.glycyarpa* - EDFSG

Assim como os demais compostos que apresentaram baixa atividade antimalárica, extrato EDFSG inibiu de maneira satisfatória as cepas apenas em sua concentração mais elevada, perdendo atividade nas demais concentrações até não apresentar mais inibição. Ainda assim, os valores estimados para sua concentração de IC₅₀ foram de 50,25µg/mL e de 49,93 µg/mL, para cepas 3D7 e W2 respectivamente. Assim sendo esse extrato apresenta baixa atividade antimalárica (AMARANTE *et. al.*, 2010) (Figura 18).

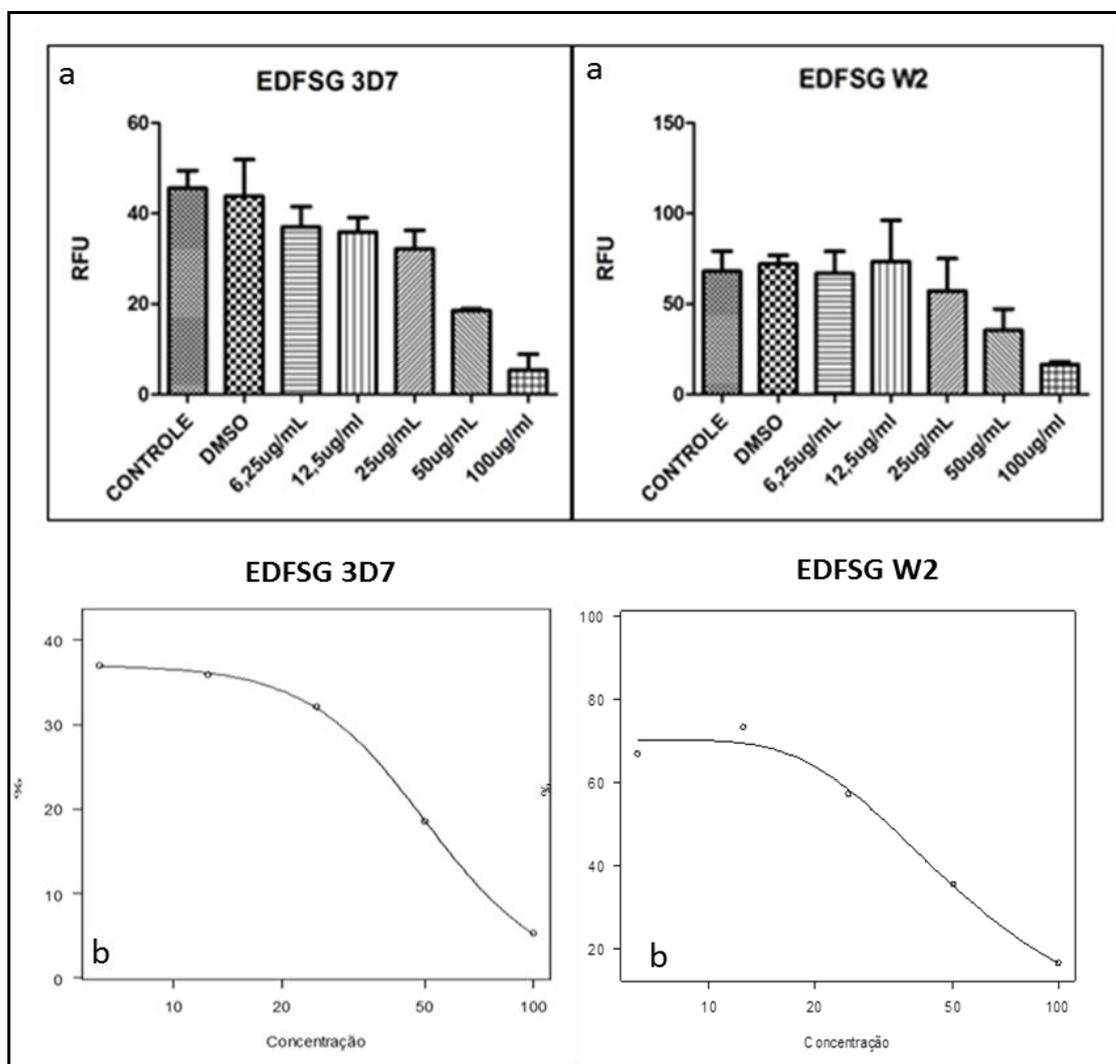


Figura 18. Gráfico de fluorescência do extrato (a); Curva de concentração inibitória (b).
Fonte: Elaborado pelo autor.

6.1.7 Inibição parasitária pelo extrato diclorometano das cascas de *S. glycyarpa* - EDFSG

Nesse ensaio em particular, os valores apresentados nessa concentração para cepa 3D7 não correspondem ao padrão de inibição das demais concentrações ou dessa mesma concentração em avaliação de W2. Os valores espectrométricos dessa concentração em especial divergem em alguns ensaios em que foi realizado e de onde a média numérica foi estimada. Portanto, nesse caso em especial assume-se falha instrumental para os valores expressados nessa concentração de 3D7, o que, segundo os mesmos critérios do extrato EDFBM, inviabilizaram a determinação de seu IC₅₀. Em contrapartida, o ensaio desse extrato frente cepas de W2 ocorreu normalmente, onde é possível notar excelente inibição parasitária em todas as concentrações avaliadas. O valor da IC₅₀ estimado para esse extrato frente a cepas resistentes de parasitas foi de 13,775 µg/mL, tão eficaz quando o extrato EDCBP avaliado anteriormente. Ainda, é possível considerarmos que o extrato é tão eficientemente inibidor de cepas 3D7 quanto é em W2, uma vez que a inibição em relação à concentração em ambos os extratos segue o mesmo padrão.

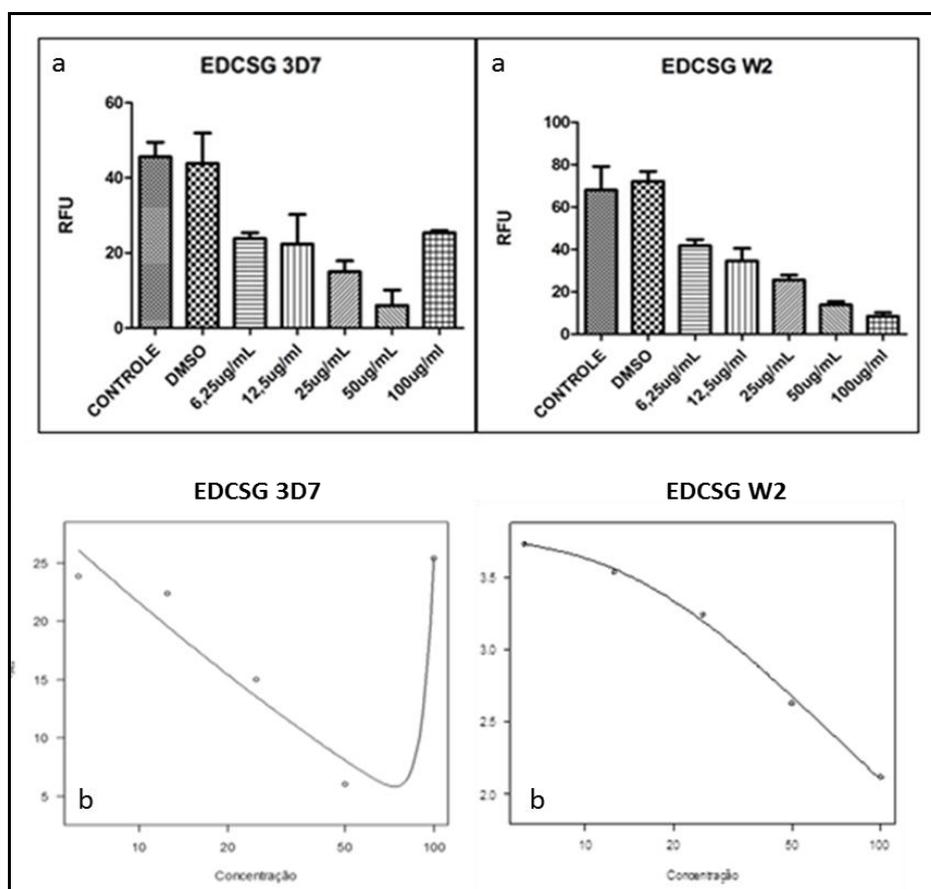


Figura 19. Gráfico de fluorescência do extrato (a); Curva de concentração inibitória (b).

Fonte: Elaborado pelo autor.

6.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INIBITÓRIA DA FORMAÇÃO DE β -HEMATINA

Conforme descrito anteriormente, o ensaio de inibição da formação de β -hematina simula o mesmo mecanismo de ação dos antimaláricos inibidores da formação de hemozoína, sendo este um dos muitos possíveis alvos terapêuticos para um antimalárico. Por isso, a ineficiência em inibir a formação da β -hematina não necessariamente descarta a possibilidade de um extrato possuir substâncias com atividade antimalárica, podendo-se afirmar apenas que tal extrato não possui substâncias capazes de inibir a formação de hemozoína.

A figura 20exibe o potencial inibitório apresentado pelos extratos durante o ensaio. A coluna C.NEG refere-se ao controle negativo, no qual foi utilizado apenas água sem qualquer interferente na formação do polímero β -hematina. A coluna C.POSIT exibe os valores do controle positivo, no qual foi utilizado o composto cloroquina a100 μ g/mL. É possível notar que o tamanho da coluna C.POSIT é menor, indicando assim que a inibição é inversamente proporcional à unidade de fluorescência.

Os extratos avaliados foram considerados inibidores de β -hematina quando os valores expressos unidades de fluorescência fossem menores que os valores do controle negativo. Nesse contexto, todos os extratos apresentaram inibição de β -hematina,entretanto, alguns inibiram mais que outros. A partir da média de inibição obtida da triplicata de cada extrato foi possível quantificar essa atividade em valores numéricos. A tabela 3apresenta esses valores.

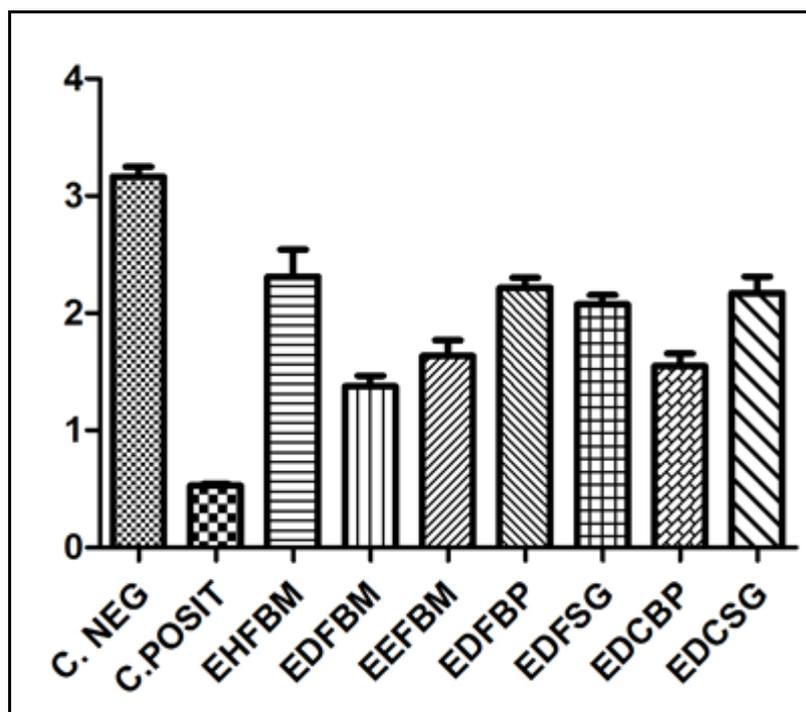


Figura 20. Inibição da formação de β -hematina. **Fonte:** Elaborado pelo auto.

Tabela 3. Unidades de fluorescência por inibição de β -hematina.

Extratos	Unidade
EHFBM	2,310
EDFBM	1,376
EEFBM	1,634
EDFBP	2,213
EDFSG	2,076
EDCBP	1,547
EDCSG	2,509
Água (C.N.)	3,166
Cloroquina (C.P)	0,527

Conforme descrito na figura 20 e tabela 3, dos extratos considerados ativos frente às cepas de *P. falciparum* (EDCBP, EDFBM, EDCSG), EDFBM apresentou maior potencial de inibição do polímero, enquanto que, o extrato EDCSG apresentou menor eficiência como inibidor da formação da β -hematina. Ainda nesse contexto, EEFBM apresentou uma atividade considerável, sugerindo que, em comparação com a atividade moderada observada no ensaio *in vitro* com *P. Falciparum* (3D7 $IC_{50} = 47,0 \mu\text{g/mL}$; W2 $IC_{50} = 45,0 \mu\text{g/mL}$), o mecanismo de

ação contra o parasita ocorra via inibição polimérica pode ser um dos mecanismos de inibição parasitária possíveis por esse extrato. Os demais extratos apresentaram baixa capacidade de inibição da β -hematina.

Teoricamente, o mecanismo de inibição envolvido na inibição do crescimento parasitário apresentada por esses extratos estão envolvidos com a capacidade de compostos presentes neles em inibir a formação de hemozoína, causando a morte do parasita assim como na ação promovida pela cloroquina. Apesar disso, estudo mais aprofundados devem ser desenvolvidos a fim de confirmar tal atividade em substâncias isoladas desses extratos.

O extrato EDCSG, apesar de ter apresentado eficiente inibição dos parasitas em ensaio *in vitro*, não apresentou uma elevada capacidade de inibir a formação de β -hematina, o que não necessariamente o inviabiliza como antimalárico. Como descrito anteriormente, o ensaio de inibição da β -hematina mimetiza uma das muitas vias metabólicas do parasita, podendo as substâncias presentes nesse extrato estar inibindo qualquer uma dessas outras vias.

Diante do exposto, os resultados obtidos indicamos extratos EDFBM, EEFBM e EDCBP como possuidores de substâncias capazes de impedir a formação de β -hematina, o que teoricamente os tornam capazes de causar a morte do parasita causador da malária pelo mesmo mecanismo de ação descrito nos medicamentos antimaláricos eritrocíticos.

6.3 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE INIBITÓRIA DE HGRPTase

A avaliação da interação entre substâncias foi possível graças ao desenvolvimento de um equipamento denominado de Biacore® (GE Healthcare), que opera através do fenômeno de ressonância nuclear plasmônica, formado por quatro componentes principais, a fonte de luz, chips sensores a base de ouro, refletores e detectores.

A substância de interesse do estudo é ligada à chips sensores formados por uma superfície de vidro coberta com uma fina camada de ouro, frequentemente modificada com uma camada de dextrano carboximetilado, formando um ambiente hidrofílico para a ligação das moléculas. Uma vez fixada, uma luz polarizada é incidida sobre a placa de ouro e o reflexo emitido por ela é detectado por um detector óptico de fluorescência, estabelecendo assim uma intensidade padrão para a molécula alvo fixada no chip (VALADARES, 2008).

Após determinada a intensidade da molécula alvo livre, um canal de fluxo contínuo é acionado no sistema, no qual transcorrem concentrações de extratos, por exemplo, mantendo-os em contato durante determinado tempo. Se interações ocorrerem entre moléculas do extrato

e a molécula alvo fixada no equipamento, o ângulo de incidência da luz polarizada sofrerá um desvio, deslocando a curva de intensidade e aumentando a unidade de detecção de luz (quantificado em “*response*” no eixo y do gráfico gerado (figura 21). Além de a interação entre as moléculas, essa técnica permite ainda estimar o tempo que essa interação permanece. Portanto, quanto maior o tempo de interação entre as substâncias e a molécula alvo, maiores são as chances dessa substância descaracterizar a ação da molécula alvo (Figura 22).

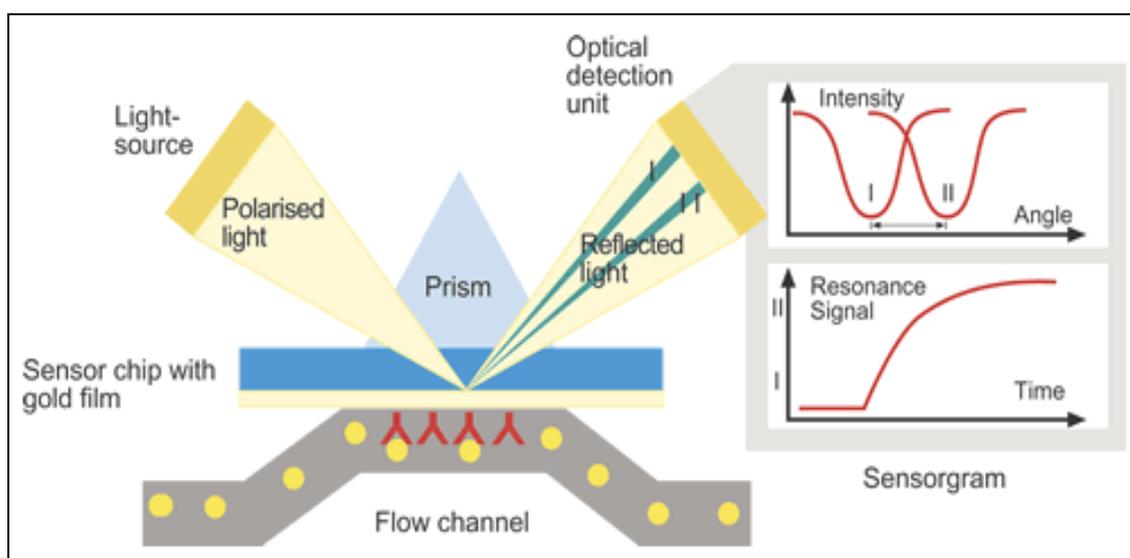


Figura 21. Esquema funcional Biacore. **Fonte:** GE HEALTHCARE, 2013.

A molécula-alvo escolhida na realização desse estudo foi a enzima hipoxantina-guanina-xantina-fosforibosiltransferase (ou HGPRTase). Esta enzima está intimamente ligada a capacidade do *Plasmodium* sp. de sintetizar bases nitrogenadas de origem púrica. A partir do ciclo eritrocítico, o parasita perde a capacidade de metabolizar purinas, obrigando-se a seqüestrar de hemoglobinas as bases purínicas com as quais sintetizará suas proteínas. Essa remoção de bases purínicas da hemoglobina é promovida justamente pela HGPRTase, e por essa razão essa enzima é considerada um alvo terapêutico para drogas antimaláricas (BALENDIRAN *et.al.*, 1999)

Esse ensaio foi realizado em parceria com a Fiocruz – Rondônia, para onde foram enviados os extratos para referida análise. A figura 22 exibe a interação dos extratos avaliados frente à enzima HGRPTase, onde é possível perceber que, dos extratos avaliados, o EEFBM (L.1) foi o único capaz de se ligar e de manter uma interação molecular com a enzima alvo por aproximadamente um minuto.

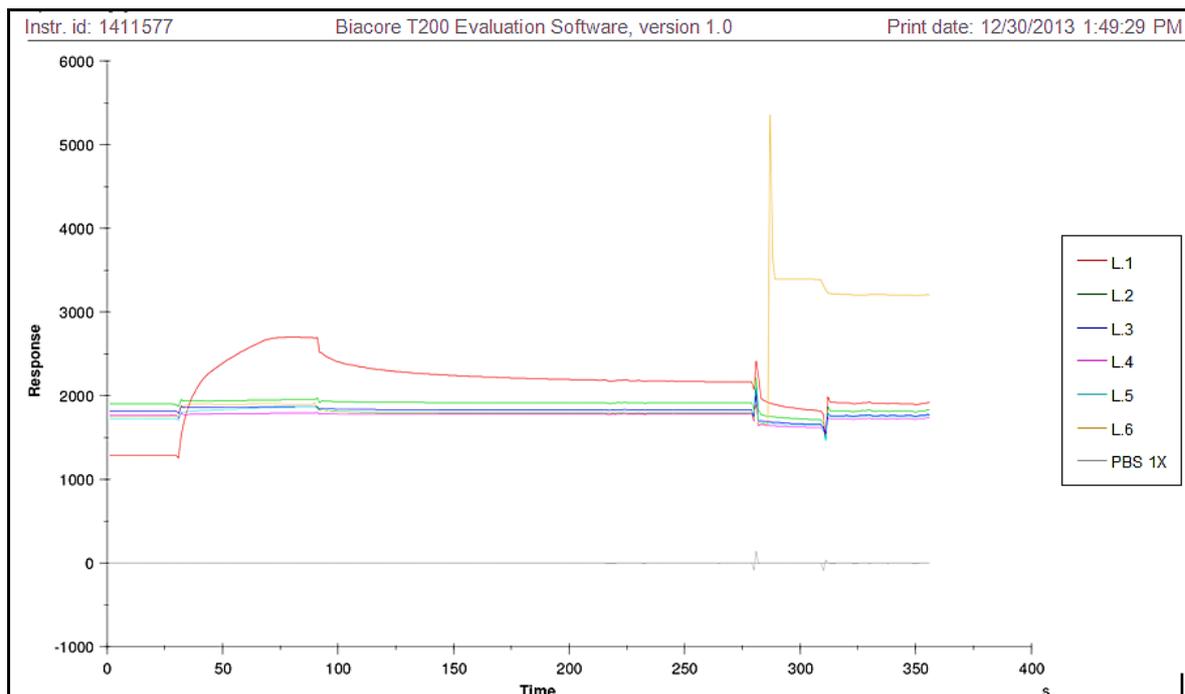


Figura 22. *Screening* Biacore frente HGRPTase. **Fonte:** Elaborado pelo autor.

A HGRPTase é uma enzima catalisadora de purinas em seres humanos, promotora da transferência reversível de grupos pirofosfatos para grupos 5-forforribosil (PRPP), formando nucleotídeos de purinainosina monofosfatos (IMP), ou monofosfato de guanossina (GMP), ligados à formação de hormônios peptídicos constituintes de membrana plasmática. NA região da enzima onde encontra-se a aminoácido Lys 68 ocorre interações entre os grupos PRPP para formar o IMP, interagindo entre si através de pontes π - π . Nos parasitas, essa mesma região cede elétrons, interagindo com átomos de pirofosfato de cadeia lateral ou com radicais R-amino de uma estrutura em que se deseja ligar, promovendo ligações entre hidrogênios. Além de ser importante para promover a interação entre substâncias, essa região também promove a estabilidade da molécula, por ligar estruturas terciárias através de ligações entre seus R-aminos (Figura 23).

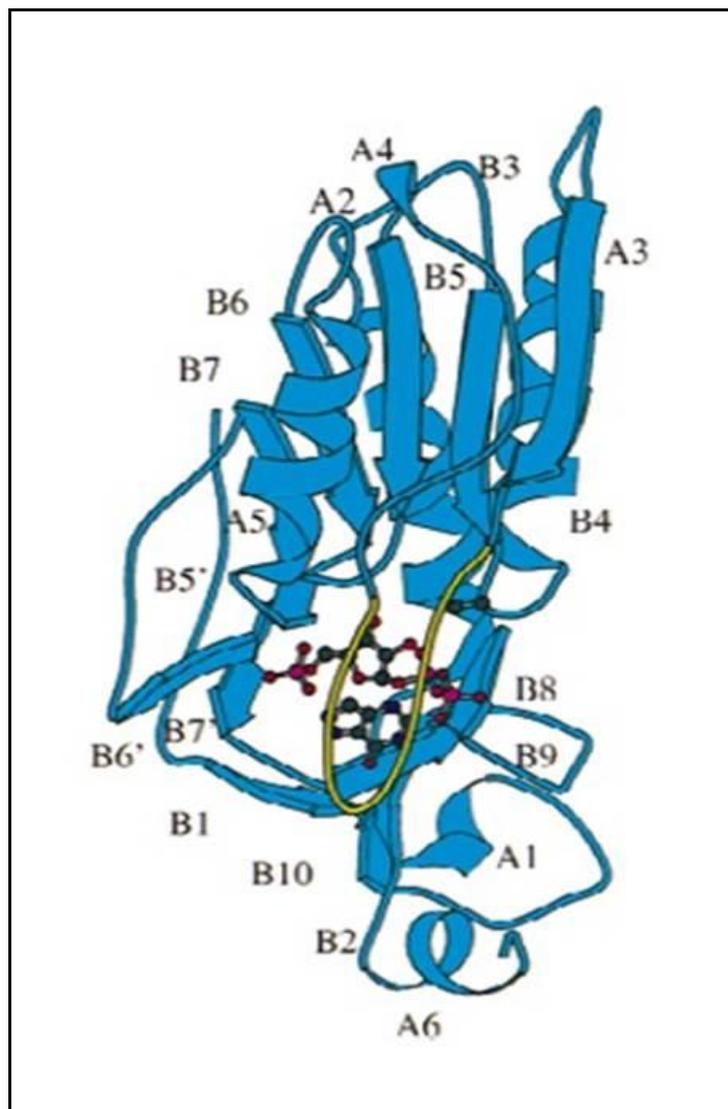


Figura 23. Enzima HGRPTase. **Fonte:** BALENDIRAN, 1999.

O aminoácido lisina é formado pela mesma estrutura geral que compõem os demais aminoácidos e uma cadeia radicalar formada por quatro metilas e uma amina na extremidade final. Por tanto, é possível sugerir que a interação promovida por esse aminoácido esteja envolvida com interações de hidrogênio entre essa enzima e componentes presentes no extrato EEFBM.

Os extratos avaliados nesse ensaio apresentavam diferentes graus polaridades, e dentre esses extratos, o que apresenta maior polaridade é justamente o extrato EEFBM, motivo pelo qual ele tenha sido o único a apresentar em sua composição substâncias capazes de interagir com a enzima alvo.

6.4 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE HEMOLÍTICA

A atividade hemolítica dos extratos foi avaliada utilizando 500 µg/mL dos diluídos em DMSO e controle positivo (saponina) em diluições em 1:2 a partir de 500 µg/mL (Figura 24). É possível notar que a formação de halos só ocorre na concentração de 500 µg/mL do padrão positivo, implicando dizer que concentrações abaixo de 500 µg/mL podem ser consideradas seguras em um ambiente sanguíneo. Em contrapartida, vale salientar que este ensaio é meramente qualitativo, informando apenas visualmente se o extrato provoca ou não lise celular em uma determinada concentração. Para que a determinação do potencial possa ser avaliada de maneira quantitativa, ensaios com técnicas mais sofisticadas devem ser realizadas.

Os extratos avaliados nesse ensaio não apresentaram atividade hemolítica. Todos os extratos foram avaliados em uma concentração de 500 µg/mL, cinco vezes maior do que a concentração máxima utilizada nos ensaios *in vitro* frente cepas de *Plasmodium* e β-hematina.

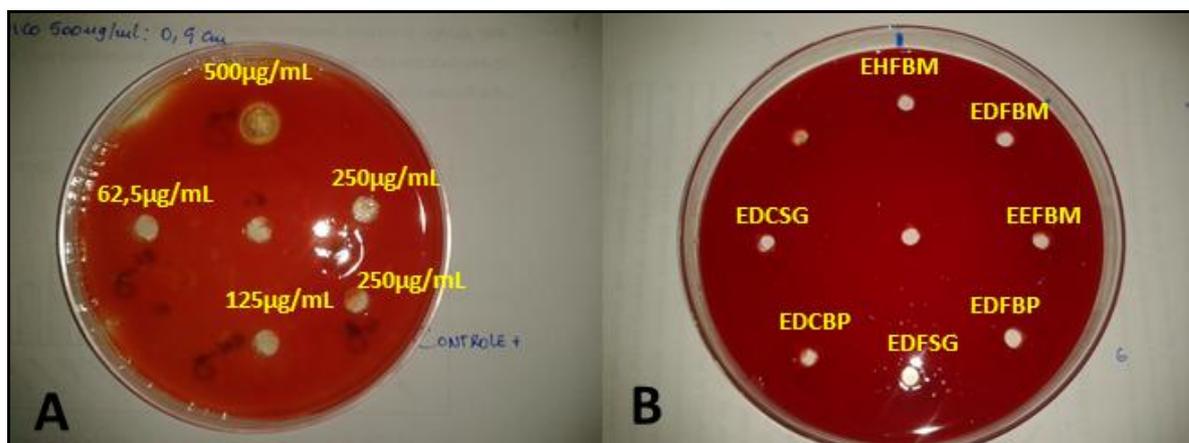


Figura 24. Controle positivo (A); Extratos (B). **Fonte:** Elaborado pelo autor.

O monitoramento de substâncias bioativas depende de uma série de condições para que os experimentos que o constituem possam ser realizados. O primeiro ensaio biológico realizado nesse estudo foi o ensaio biológico *in vitro* frente a cepas sensíveis e resistentes à cloroquina. O primeiro critério para a realização desse experimento foi a solubilidade dos extratos obtidos em DMSO, solvente comumente utilizado em ensaios biológicos por não apresentar toxicidade a células humanas. Dos doze extratos obtidos, apenas sete mostraram-se solúveis em tal solvente. Por essa razão, esse e os demais experimentos foram realizados apenas com os extratos que apresentaram tal condição.

Após a avaliação da atividade antimalárica, fez-se também necessário propor mecanismos de ação pelos quais as moléculas antimaláricas presentes nos extratos ativos pudessem estar atuando. Nesse contexto, os ensaios de inibição da β -hematina e o ensaio de inibição de HGPRTase indicam essas vias de inibição bioquímica. A hemina, uma substância orgânica extraída do fígado de bovinos, é análoga à Fe(III)PPIX, e sob as mesmas condições, polimeriza-se em β -hematina, analogamente semelhante ao pigmento malárico polimerizado pelo parasita. Assim sendo, foi possível reproduzir *in vitro* a polimerização desse composto bovino e ainda avaliar a capacidade dos extratos em inibição tal formação. Uma vez inibidor de β -hematina, tais extratos podem também serem considerados inibidores de hemozoína.

O ensaio de inibição de HGRPTase propôs um alvo terapêutico diferenciado do ensaio de β -hematina. Essa proteína exerce papel fundamental na síntese de DNA no parasita. Uma vez inibida, o parasita perde a capacidade de sintetizar DNA e morre. Para que possam ser considerados possíveis precursores antimaláricos, os extratos que apresentaram tal atividade biológica não podem apresentar qualquer tipo de dano à células sanguíneas. Por essa razão foi realizado o ensaio hemolítico. De forma resumida, os ensaios biológicos realizados no presente estudo buscaram detectar a atividade antiplasmódicas e seus mecanismos de ação pelos quais as moléculas estariam atuando, ao mesmo tempo em que os riscos de serem administrados em células sanguíneas eram avaliados. A tabela 4 exhibe o resultado dos extratos avaliados em cada um desses momentos.

Tabela 4. Avaliações biológicas e farmacológicas dos extratos selecionados.

<u>Extrato</u>	<u>Numeração</u>	<u>Atividade hemolítica</u>	<u>Inibição da β-hematina (UF)</u>	<u>Inibição <i>P. falciparum</i> IC₅₀ ($\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$)</u>		<u>Inibição HGRPTase</u>
				3D7	W2	
EHFBM	1	N	2,230	52,52	57,166	N
EDFBM	2	N	1,376	-	-	N
EEFBM	3	N	1,634	46,98	44,998	P
EDFBP	4	N	2,213	47,84	71,037	N
EDCBP	5	N	2,076	14,39	12,172	N
EDFSG	6	N	1,547	50,25	49,934	N
EDCSG	7	N	2,509	-	13,172	-

EHFBM – Extrato hexânico das folhas de *B. multiflora*;
EDFBM – Extrato diclorometano das folhas de *B. multiflora*;
EEFBM – Extrato etanólico das folhas de *B. multiflora*;
EDFBP – Extrato diclorometano das folhas de *B. pleiosperma* ;
EDCBP – Extrato diclorometano das cascas de *B. pleiosperma*;
EDFSG – Extrato diclorometano das folhas de *S. glycyarpa*;
EDCSG – Extrato diclorometano das cascas de *S. glycyarpa*;

N – atividade negativa;
P – atividade positiva;
 - atividade indeterminada;

Atividade em relação o IC₅₀: Elevada: abaixo de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$;
 Moderada: entre 10 e 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$;
 Baixa: entre 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$;
 Nula: acima de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Atividade em β -hematina: Positivo abaixo de 3,16 Unidades de fluorescência.

Os ensaios biológicos realizados revelaram os extratos EDFBM, EEFBM, EDCBP e EDCSG como possuidores de compostos antimaláricos em sua constituição.

Os extratos mais ativos contra as cepas de *P. falciparum* foram o EDFBM, EDCBP e EDCSG. O extrato EDFBM apresentou a maior apesar de não ter sido possível mensurar seu IC50, observando-se uma atividade biológica acentuada mesmo na concentração de 6,25 µg/mL bem mais contundente que nos demais extratos considerados ativos.

Considerando o provável mecanismo de ação dos extratos ativos, conforme os resultados obtidos nos ensaios de inibição da β-hematina e de interação com a enzima HGPRTase (Biacore), pôde-se identificar dois eventos. O primeiro está relacionado a inibição da formação da β-hematina observada claramente em EDFBM, a mais ativa contra cepas de *P. falciparum*. O segundo evento indica um mecanismo de ação diferenciado para EEFBM, que apesar de ter apresentado menor atividade contra *P. falciparum*, mostrou uma forte interação com a enzima HGPRTase.

Diante os resultados obtidos, os extratos mais promissores foram EDFBM, EEFBM, EDCBP e EDCSG. A etapa seguinte desse estudo avaliou o perfil químico desses extratos através de diferentes técnicas cromatográficas, a fim de identificar a substância responsável por tal atividade em cada um desses extratos.

6 RESULTADOS

CAPÍTULO 2: AVALIAÇÕES QUÍMICAS

6.5 AVALIAÇÃO DO PERFIL CROMATOGRÁFICO EM CCD

Os extratos que tiveram sua atividade antimalárica comprovada pelos ensaios biológicos foram analisados por cromatografia. Os perfis cromatográficos dos extratos foram obtidos inicialmente por cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando como fase estacionária gel de sílica e como fase móvel uma combinação de solventes de acordo com a polaridade de cada extrato. A tabela 5 demonstra os reveladores químicos utilizados nessa avaliação, bem como a correlação entre a coloração e a classe de substâncias presentes neles.

Tabela 5. Reveladores utilizados em CCD.

REVELADOR	COMPOSTO	COLORAÇÃO
KOH	Antraquinonas Cumarinas	Vermelho (Vis): Antraquinonas Amarelo (Vis): Antronas Luz azul (UV-365nm): Cumarinas
Vanilina Sulfúrica	Saponinas terpenos e fenilpropanoides	Vermelho, amarelo, marrom , azul-esverdeado (Vis): Princ. Amargos. Azul (Vis): fenilpropanoides
Dragendorff	Alcaloides	Laranja/Marrom (Vis)
NP/PEG	Flavonoides	Amarelo, verde ou laranja (UV-365nm)

Nas placas, os extratos foram numerados conforme mostrado na tabela 4 (ver página 60), e seus perfis cromatográficos foram obtidos em CCD composta por sílica de fase normal como fase estacionária e como fase móvel a mistura dos eluentes hexano e acetato de etila, na proporção 1:1 (figura 25).

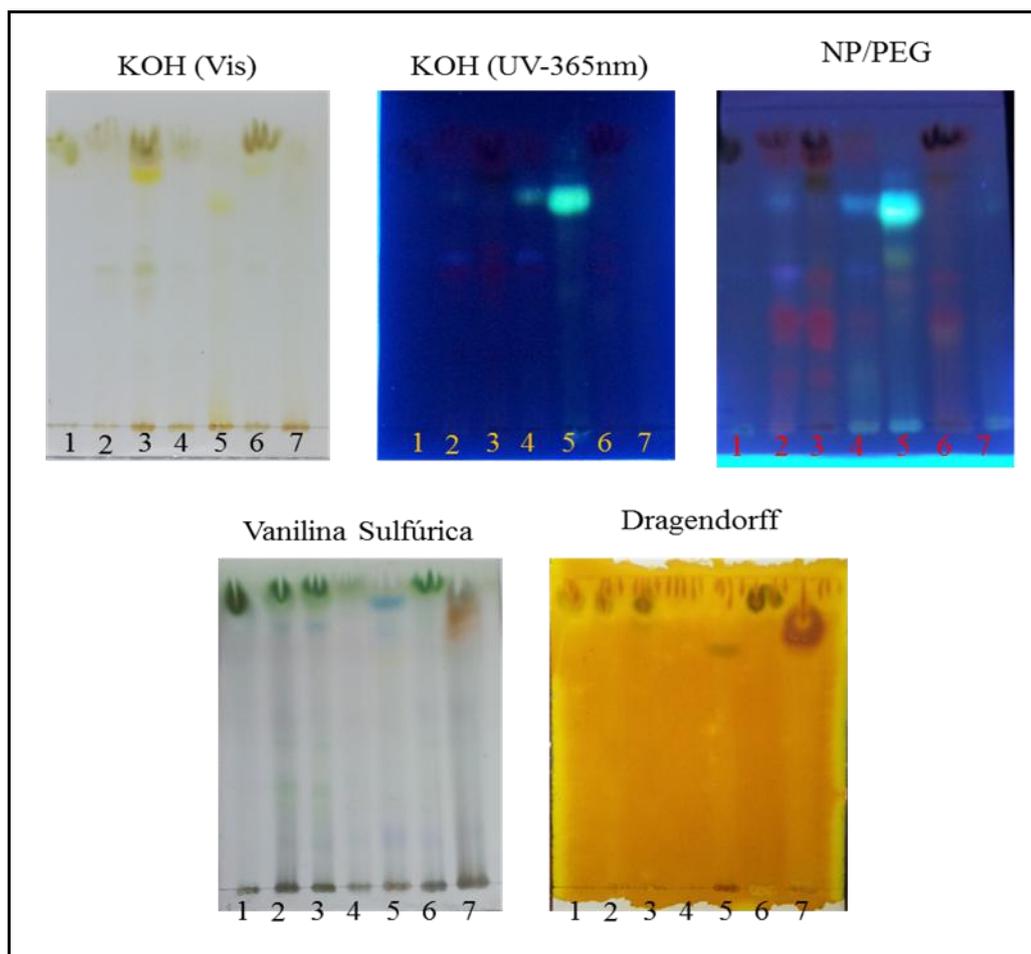


Figura 25. Perfil fitoquímico por CCD. **Fonte:** Elaborado pelo autor.

De acordo com Wagner e Blat (1996), analisando primeiramente a placa revelada com KOH, é possível notar que os extratos EEFBM (3), EDCBP (5) e EDFSG apresentaram uma intensa banda amarelada, característica de compostos fenólicos, possivelmente da classe das antronas.

Quando avaliada sob luz UV-365 nm, alguns extratos apresentaram absorção, contudo, EDCBP (5) revelou uma intensa banda de coloração fluorescente, indicando a presença de duplas conjugadas, possivelmente de anéis aromáticos ou outro tipo de composto dessa natureza cromófora.

O revelador PEG tem como função revelar compostos da de classe química flavonoide. Na placa (figura 25) foi possível observar que os extratos EDFBM (2) e EEFBM (3) apresentam bandas de coloração avermelhada, assim como o composto EDFSG (6), que além de bandas na coloração alaranjada apresentou também uma banda de colocação amarela. O extrato EDCBP apresentou bandas de coloração alaranjada, esverdeada e um intenso azul fluorescente, de mesmo RF que a banda apresentada por avaliação em KOH. Na literatura

essa coloração não apresenta um significado pré-estabelecido, entretanto, sabe-se que substâncias com tal comportamento cromóforo são geralmente formadas por duplas conjugadas, e no caso desse revelador, essas duplas geralmente pertencem a anéis aromáticos. É possível que essa banda seja formada por um composto dessa natureza, e como será descrito posteriormente, também não pertence à classe dos alcaloides, podendo dessa maneira limitar as possibilidades de tal composto ser realmente um flavonoide ou outro composto de estrutura molecular semelhante. Os demais extratos não apresentam coloração característica de flavonoides.

O Dragendorff é um revelador químico característico para alcaloides. Na placa (figura 25) é possível observar a presença de alcaloides apenas no extrato EDCBP (5) e no extrato EDCSG (7). Em EDCSG, uma intensa banda na parte superior da placa pode ser observada, de coloração marrom, indicando a presença de alcaloides. Em EDCSG, os alcaloides permaneceram na base da corrida, podendo ser observado na mesma coloração que os alcaloides vistos no extrato descrito anteriormente. Portanto, dos extratos avaliados até o momento, apenas EDCSG e EDCBP apresentam manchas características com reagente Dragendorff que podem ser associadas a alcaloides.

O revelador vanilina sulfúrica é considerado um revelador universal por revelar grande parte das classes químicas existentes, classificados como princípios amargos. Na placa (figura 25) é possível observar a presença de bandas esverdeadas, representando pigmento clorofila. A tabela 6 exhibe as classes químicas identificadas em cada um dos extratos avaliados.

Tabela 6. Classes químicas identificadas por CCD.

Numeração	Extrato	Prováveis Classes químicas
1	EHFBM	Porfirinas
2	EDFBM	Flavonoides, antronas, antraquinona e cumarinas
3	EEFBM	Flavonoides, antronas, antraquinona e cumarinas
4	EDFBP	Flavonoides antronas, antraquinona e cumarinas
5	EDCBP	Alcaloides, flavonoides

6	EDFSG	Flavonoides
7	EDCSG	Alcaloides

Dentre as classes de substâncias identificadas, duas são amplamente descritas na literatura como possuidoras de atividade antimalárica direta ou indiretamente, os flavonoides e os alcaloides. Como já descrito anteriormente, os principais compostos antimaláricos são os alcaloides ou derivados de sua estrutura, atuando na fase eritrocítica do ciclo de vida do *Plasmodium* sp. (ver tópico 2.4). Os flavonoides por sua vez atuam de maneira diferenciada no organismo do hospedeiro. A lise celular promovida pela replicação do parasita libera no organismo humano uma diversidade de compostos residuais oxidantes, que se ligam a diversas moléculas importantes para o hospedeiro tais como enzimas, proteínas, células e demais compostos. A literatura denomina essas substâncias, naturalmente presente no organismo humano, como radicais livres. Uma vez em excesso, ocorre uma depressão orgânica no hospedeiro, causando sensação de fadiga e mal, típicos sintomas de alguém infectado por malária. Os flavonoides atuam como antioxidantes ao se ligarem à esses resíduos oxidativos, diminuindo assim o mal estar causado pela doença, além de diminuir também os efeitos colaterais causados pela oxidação dos próprios compostos antimaláricos.

6.6 AVALIAÇÃO DO PERFIL CROMATOGRÁFICO POR CG-EM e CLAE

6.6.1 Perfil do extrato hexânico das folhas de *B. multiflora* –EHFBM

O extrato EHFBM apresenta em sua constituição substâncias de baixa polaridade, uma vez que o solvente utilizado para sua extração compartilha tal característica. Apesar da avaliação em CCD não ter revelado a classe das substâncias presente nesse extrato, foi possível observar através da análise por CG-EM a presença majoritária de compostos sesquiterpênicos em sua constituição. Do número total de compostos detectados, 72% deles puderam ser identificados através da comparação de seus fragmentos espectrométricos. Foi utilizado como critério de identificação de compostos nessa análise o limite de índice de similaridade acima de 90%. O cromatograma de íons totais pode ser observado na figura 26.

Tabela 7. Substâncias presentes no extrato EHFBM.

Constituintes	% Área
β -elemeno	4,4
β -cariofileno	1,1
α -bergamoteno	2,4
β -selineno	1,6
α -selineno	1,1
β -bisaboleno	3,3
Cubebol	1,6
<i>cis</i> - α -bisaboleno	2,3
(E)-diidro-farnesol	0,7
Espatuleno	8,1
Óxido de cariofileno	1,3
Ácido dodecanoico	0,5
Atlantol	0,6
Humuleno 1,2-epóxido	0,6
5-Epi-Neointermedeol	1,8
Isoespatuleno	0,3
Tetradecanoato de etila	1,1
Ácido hexadecanóico	1,2
Ácido octadecadienoico	0,9
Ácido 9-octadecenóico	2,1
Fitol	4,6
Ácido octadecanóico	0,7
Tricosano	0,3
Tetradecanoato de butila	0,4
Pentacosano	0,5
Heptacosano	6,3
Octacosano	1,0

Tetracosahexaeno	0,8
Nonacosano	17,8
Triacotano	1,1
β -Tocoferol	0,5
Docosano	7,6
Vitamina E	2,3
Stigmasta-5,22-dien-3-ol	1,2
Stigmast-5-en-3-ol	1,7

Dentre as substâncias principais observados, o espatulenol, conforme é descrito na literatura, apresenta diversas atividades biológicas. RAMOS *et. al.* (2013) sugerem uma correlação entre o espatulenol e a atividade anti-inflamatória presente nos óleos essenciais das folhas de algumas espécies do gênero *Croton*. Isoladamente, sabe-se que o espatulenol é ativo contra células cancerígenas humanas e que também atua como repelente contra os mosquitos *Aedes aegypti* e *A.stephensi* (CANTRELL *et. al.*, 2005; GILLIJ, 2008). Como antimalárico nenhum dos compostos identificados nesse extrato foi avaliado até o momento.

6.6.2 Perfil do extrato diclorometano das folhas de *B. multiflora* - EDFBM

A técnica de CG-EM mostrou-se parcialmente eficiente na identificação dos constituintes desse extrato, identificando 62% de seus constituintes. É possível que as demais substâncias não apresentem polaridade adequada para a separação de constituintes por essa técnica, que avalia preferencialmente compostos voláteis. A figura 27exibe seu cromatograma de íons totais e a tabela 8 as substâncias identificadas.

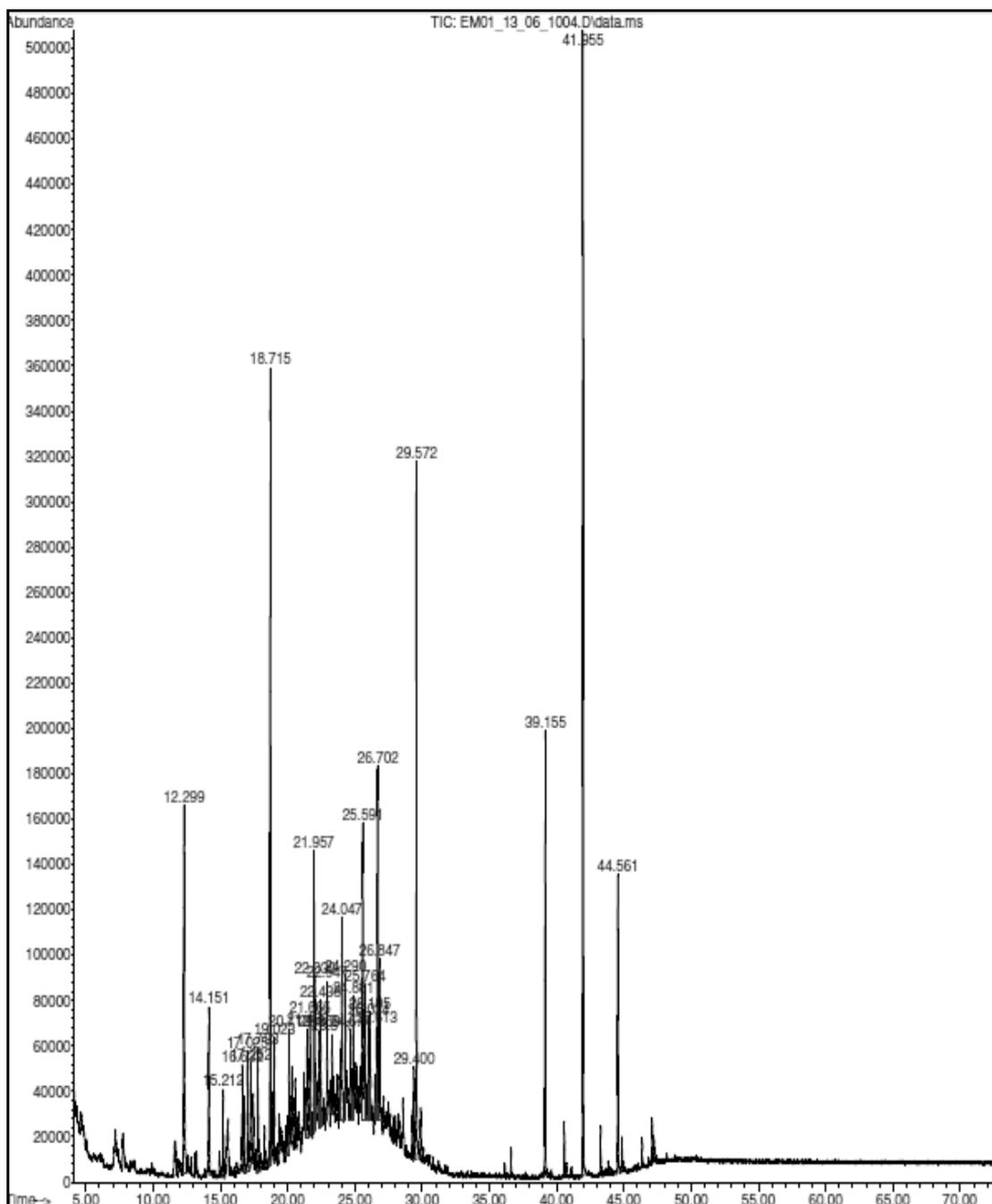


Figura 27. Cromatograma de íons totais de EDFBM. **Fonte:** Elaborado pelo autor.

O constituinte majoritário desse extrato também é o nonacosano, enquanto que o segundo componente mais abundante é o sesquiterpenos espatulenol (9,0%). Como já abordado anteriormente, alguns terpenos, principalmente os monoterpênicos e os sesquiterpenos, possuem a capacidade de proteger o organismo contra agentes oxidantes (SIMÕES *et. al.*, 2007). Até o momento não existem estudos que comprovem o espatulenol como substância antimicrobiana. Entretanto, Okokon *et. al.*, (2011) avaliaram os óleos essenciais

das raízes de *Croton zambesicus*, utilizada medicinalmente contra malária no continente africano. O óleo é composto majoritariamente por espatulenol e linalol.

O diterpeno fitol é um metabólito comum nas plantas e é descrito na literatura como uma substância possuidora de atividade antitumoral e bactericida (LANFER-MARQUEZ, 2007). Essas atividades possuem a capacidade de destruir células com alto grau de especificidade, um dos requisitos básicos para um composto terapêuticos. Apesar disso, nenhum estudo foi descrito a respeito da atividade antimalárica de tal componente, indicando-o assim como um possível candidato para a submissão do ensaio. Apesar de apresentar características que também implicam numa possível desnaturação das hemácias (ligação entre o colesterol presente em suas membranas plasmáticas) o ensaio hemolítico inviabilizou qualquer possibilidade da concentração desse componente estar relacionada à desnaturação celular. Ainda assim, faz-se necessários maiores estudos a respeito de seu comportamento frente ao ensaio antimalárico *in vitro* e seus comportamento perante as hemácias.

Nem sempre a atividade biológica de um extrato está relacionada a presença da substância majoritário. É possível (e muito comum) que tal atividade esteja relacionada ao minoritário, ou ainda a um conjunto de compostos substâncias minoritários – fenômeno denominado sinergismo. Por isso, para que afirmações sejam feitas a respeito de qual substância está sendo o responsável por tal atividade, é necessário que estes sejam avaliados separadamente.

Tabela 8. Composição química de EDFBM.

Constituintes	% Área
β -Elemeno	2,7
<i>trans</i> - α -bergamoteno	1,1
β -Selineno	1,5
β -Bisaboleno	1,6
α -amorfeno	1,5
<i>cis</i> - α -bisaboleno	1,7
Espatulenol	9,0
Laurato de Etila	1,2

decapentaneno	2,1
Loliolida	1,4
Neofitadieno	1,9
Vulgarol B	1,9
Ácido hexadecanóico	1.3
Fitol	7,6
Heptacosano	4,8
Nonacosano	13,2
Nonadecano	3,6

6.6.3 Perfil do extrato etanólico das folhas de *B. multiflora* – EEFBM

Devido a sua natureza polar, o extrato EEFBM foi avaliado pela técnica de cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas - CLUE-EM. O perfil cromatográfico obtido com monitoramento em 254 nm apresentou sete substâncias principais de boa resolução. A figura 28 apresenta o perfil cromatográfico do EEFBM obtido por CLAE-DAD, enquanto a tabela 9 contém a relação das principais substâncias detectadas por essa técnica.

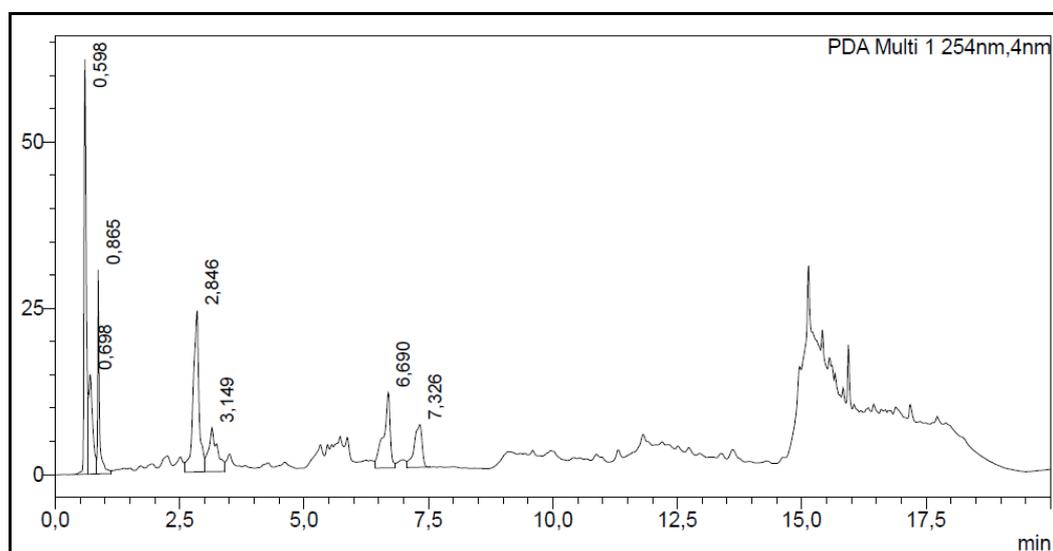


Figura 28. CLAE-DAD de EEFBM monitorado a 254 nm. **Fonte:** Elaborado pelo autor.

A tabela 9 contém a relação das principais substâncias detectadas por essa técnica.

Tabela 9: Sinais obtidos por CLUE-DAD.

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area%
1	0,598	199075	62326	24,437
2	0,698	83217	14877	10,215
3	0,865	75591	30683	9,279
4	2,846	199294	24239	24,464
5	3,149	79027	6568	9,701
6	6,690	107761	11358	13,228
7	7,326	70669	6443	8,675
Total		814633	156494	100,000

Os espectros das sete substâncias principais localizadas entre 0,5 e 8,0 minutos apresentaram absorções características no UV de substâncias fenólicas. O sinal em 2,84 minutos, pico número 04, apresentou um espectro no UV que mostra máximos de absorção em 216 e 326, em concordância com aqueles obtidos na literatura para compostos fenólicos (JIMÉNEZ *et. al.*, 2014).

A análise por CLUE-EM de EEFBM no modo negativo revelou para a substância 04 o íon molecular com m/z 353 e um fragmento com m/z 191. A análise do espectro de absorção no UV e padrão de fragmentação observado para a substância 04 indica a presença do ácido 5-cafeoilquinico, conhecido como ácido clorogênico (Figura 29).

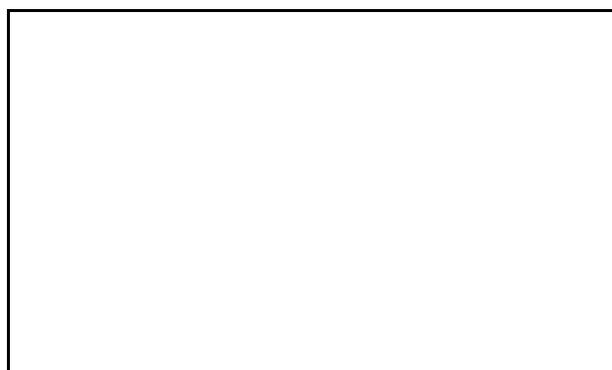


Figura 29. Ácido clorogênico. **Fonte:** Elaborado pelo autor.

São relatadas diversas atividades biológicas para o ácido clorogênico, por exemplo, antioxidante, antibacteriana, anticarcinogênica.

6.6.4 Perfil do extrato diclorometano das folhas de *B. pleiosperma* – EDFBP

As substâncias majoritárias encontradas nesse extrato foram o β -bisaboleno e o fitol representando 38,57% e 36,32% do extrato, respectivamente, mostrado nos picos de maior intensidade no cromatograma de íons totais (figura 30).

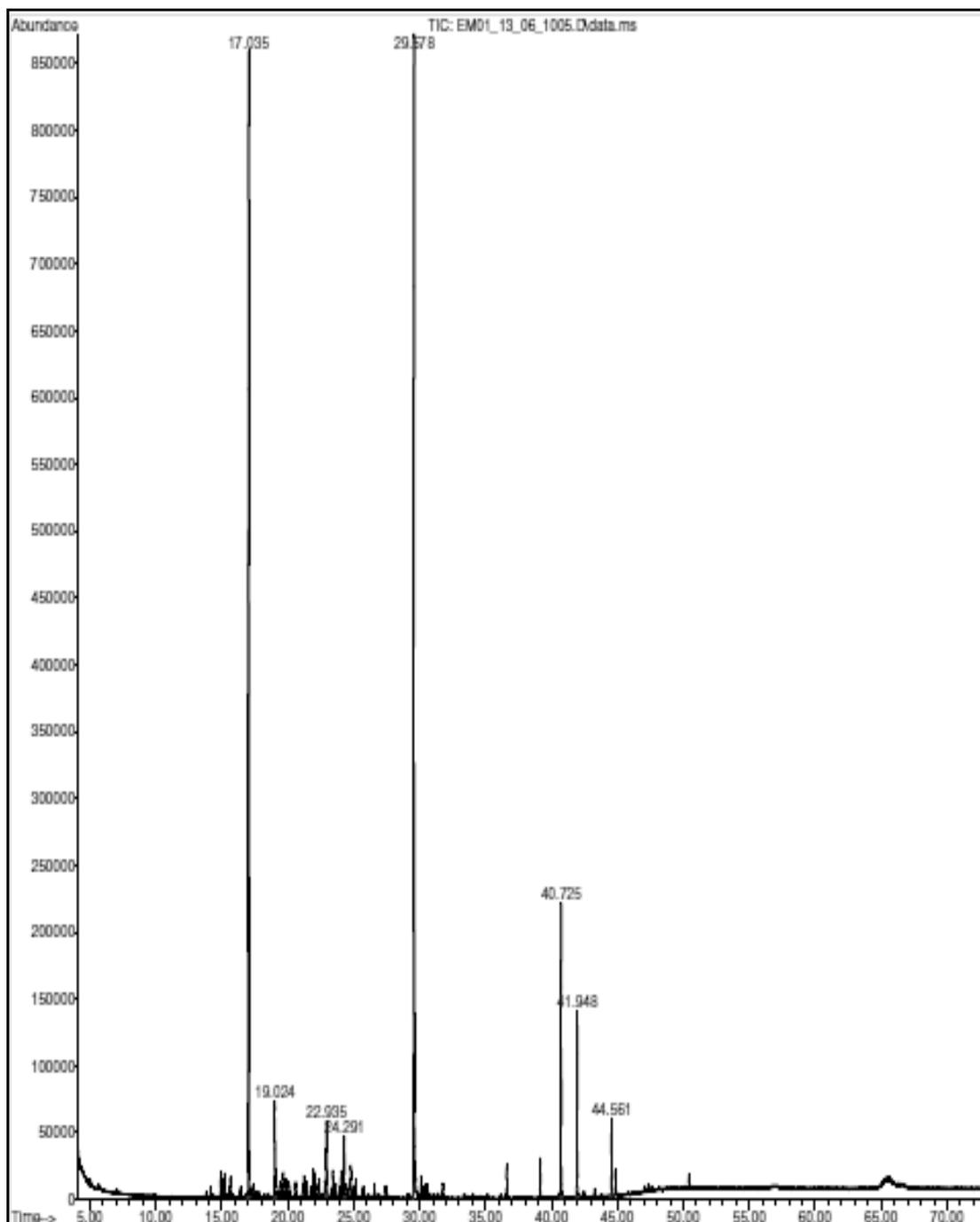


Figura 30. Cromatograma de íons totais de EDFBP. **Fonte:** Elaborado pelo autor.

Essas mesmas substâncias estão presentes no extrato EDFBM, porém em concentrações diferenciadas. O fato de pertencerem ao mesmo gênero possibilita que tais espécies produzam as mesmas substâncias, porém, em concentrações diferenciadas, o que pode estar diretamente relacionado à presença da atividade em questão. A tabela 10 exibe os compostos identificados por CG-EM.

Tabela 10. Substâncias presentes em EDFBP.

Constituintes	% Área
β -Bisaboleno	38,57
Laurato de etila	2,82
Liliolida	2,41
Neofitadieno	1,73
Fitol	36,32
Tetracosahexaeno	9,39
Nonacosano	6,17
Hentriacontano	2,60

O sesquiterpeno β -bisaboleno e o fitol representam juntas mais da metade das substâncias constituintes desse extrato. Segundo a literatura, a substância β -bisaboleno não apresenta atividade antimalárica, entretanto, é diversamente descrita como anti-inflamatória, analgésica, antiulcerogênica, antiviral e abortiva (MUNIZ, 2009; MACIEL *et. al.*, 2002).

Apesar de não apresentarem atividade antimalárica isoladamente, os sesquiterpenos constituem a base das novas drogas antimaláricas presentes no mercado. A artemisinina é um sesquiterpeno lactona e seu mecanismo de ação está baseado principalmente na formação de um aduto resultante de uma reação entre o átomo de carbono na posição β da ligação dupla conjugada ao grupo carbonila do anel lactâmico com o átomo de enxofre de aminoácidos presentes em enzimas, proteínas e membranas, como por exemplo a cisteína. A reação é o ataque nucleofílico do átomo de enxofre ao carbono da ligação dupla através de uma adição de Michael (SCHMIDT, 1999; POSNER *et. al.*, 1999).

6.6.5 Perfil do extrato diclorometano das cascas de *B. pleiosperma* –EDCBP

O extrato EDCBP mostrou-se eficaz quanto a inibição de parasitas causadores de malária. A avaliação do extrato por CG-EM não foi capaz de identificar essa diversidade molecular de substâncias, limitando-se a identificação de substâncias terpênicas e alcanos (tabela 11).

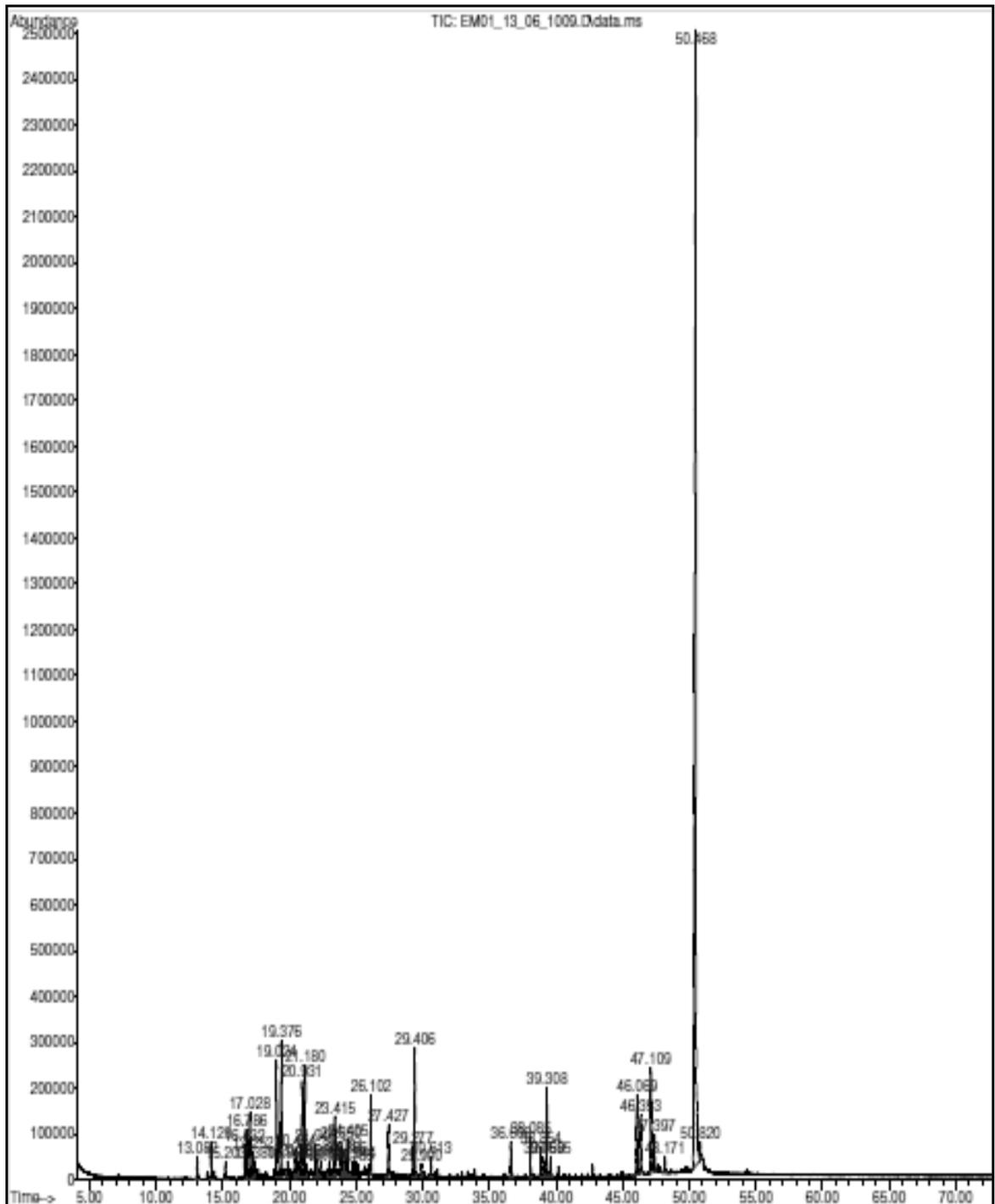


Figura 31. Cromatograma de íons totais de EDCBP. **Fonte:** Elaborado pelo autor.

Tabela 11. Substâncias presentes em EDCBP.

Constituintes	% Área
α -cubebeno	0,64
β -cubebeno	0,98
Isopropenil-biciclo	0,36
β -selineno	0,85
α -selineno	1,17
β -bisabolenoleno	1,30
Ác. Dodecanóico	0,27
Laurato de etila	2,12
β -maalieno	0,36
Tetradecanoato de etila	0,85
Ác. Tetradecenóico	1,33
Ác. Hexadecanóico	2,32
Ác. 9,12-octadecadienóico	0,54
Ác. 9-octadecenóico	3,09
Ác. Tetracosanoico	0,43
4,5,6,7-tetrahidro-7-metil	2,21
Estigmasterol	1,27
Lanosta-8,24-dien-3-ol	0,80
Policarpol	55,98

O policarpol foi a substância presente em maior concentração na mistura, representando aproximadamente 56% do extrato e expresso no cromatograma de íons totais como o pico com tempo de retenção em 50,45 minutos (figura 33). Esse triterpeno foi descrito pela primeira vez na década de setenta, ao ser extraída das cascas de *Polyalthia oliveri* e *Meiocurpidium lepidotum*, pertencentes a família Annonaceae. A partir de então o policarpol tem sido isolado de diversas espécies dessa família e tem sido descrito na literatura como possuidor de diversas atividades biológicas tais como antifilária, antitripanossômica,

antimicrobiana e citotóxica (LEBOEUF *et. al.*, 1982; NGANTCHOU *et. al.*, 2009; NYASSE *et. al.*, 2006).

A filariose e a doença de chagas são doenças causadas por parasitas intracelulares assim como a malária, e apesar de apresentarem alvos terapêuticos diferenciados, compartilham algumas vias metabólicas. Nesses parasitas os quimioterápicos visam inibir enzimas envolvidas na via glicolítica do parasita, o que lembra o mecanismo de ação das moléculas inibidoras de HGRPTase descritas no capítulo de ensaios biológicos. Assim sendo é possível que atividade antimalárica apresentada por esse extrato seja o resultado da ação do Policarpol, entretanto, a confirmação dessa hipótese só poderá ser provada quando o mesmo for testado isoladamente, e seu mecanismo de ação também for avaliado.

6.6.6 Perfil do extrato diclorometano das folhas de *S. glycyarpa* - EDFSG

A avaliação desse extrato por CCD não apresentou diversidade de classes químicas, evidenciando apenas a presença de alguns compostos fenólicos e alcaloídicos que não puderam ser detectados pela técnica de CG-EM, possivelmente devido a sua elevada polaridade. A maioria dos compostos identificados são terpênicos, exibidos em picos segundo sua quantidade no extrato conforme mostra a figura 32. Foram identificadas 16 substâncias em EDFSG (tabela 12), representando 69,14% do extrato.

Tabela 12. Substâncias presentes em EDFSG.

Constituintes	% Área
<i>trans</i> -cariofileno	1,79
γ -elemeno	1,33
Germancreno D	1,29
Laurato de etila	1,54
Liliolida	3,50
Neofitadieno	5,16
Ácido 9,12,15- Octadecatrienóico	0,94
Fitol	2,07
Ácido Linoleico	14,11

Linolenato e etila	14,34
Mandelol	12,30
Ácido 1,2- benzenocarboxílico	2,39
Eicosano	0,76
Vitamina E	1,15
Estigmasta-5-en-3-ol	1,77
Ácido ursenólico	4,70

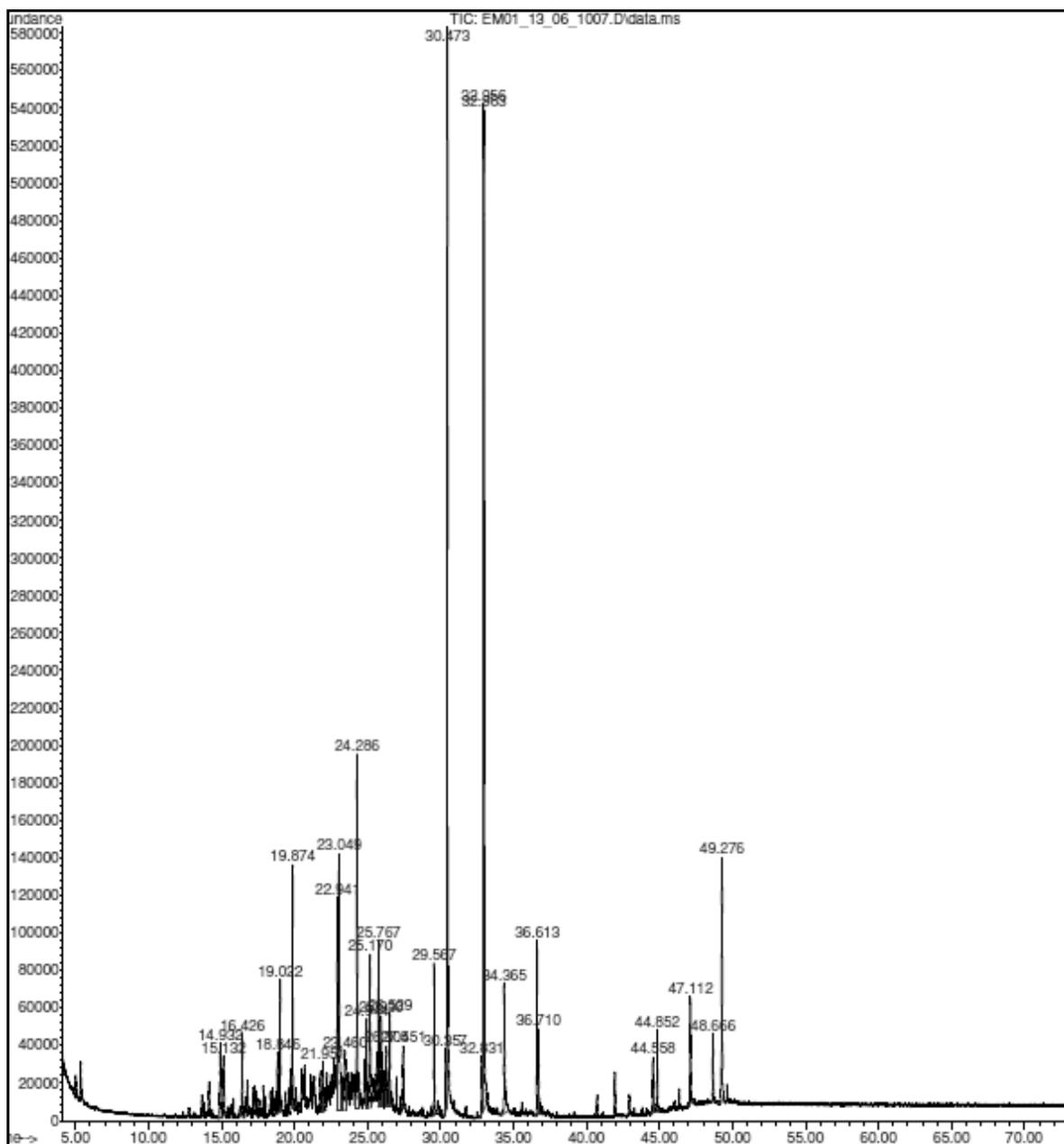


Figura 32. Cromatograma de íons totais de EDFS. **Fonte:** Elaborado pelo autor.

6.6.7 Perfil do extrato diclorometano das cascas de *S. glycyarpa* –EDCSG

A figura 33 apresenta o cromatograma de íons totais de EDSG. Foram identificadas por CG-EM 13 substâncias, representando 41,3% do extrato. Nesse contexto, foram identificadas sesquiterpenos, lignanas, a sesamina, epiendesmina e fargesina, ácidos graxos, esteroide e triterpenos. Portanto, essa análise mostrou-se pouco eficiente no contexto de identificação com substâncias presentes nesse extrato.

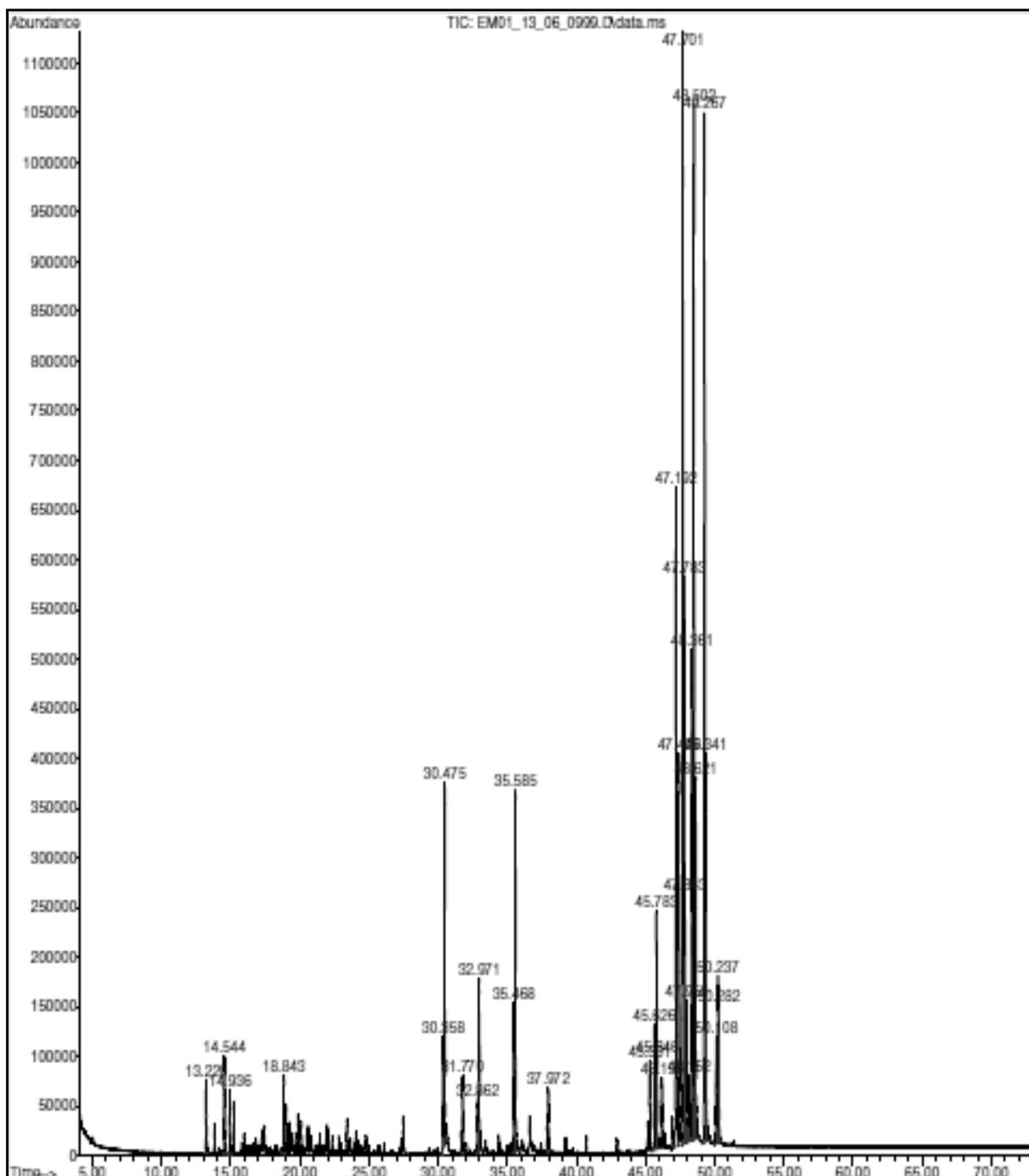


Figura 33. Cromatograma de íons totais de EDCSG. **Fonte:** Elaborado pelo autor.

A tabela 13 mostra os compostos que puderam ser identificados pela técnica de CG-EM, dos quais nenhum apresenta relato na literatura quanto a presença de atividade antimalárica.

Tabela 13. Substâncias presentes em EDCSG.

Constituintes	% Área
Cipereno	1,12
β -cariofileno	0,73
Óxido de cariofileno	0,79
Cicloocteno	0,72
Ácido 9,12,15-octatrienóico	2,88
Sesamina	0,97
Fargesina	2,05
Éter dimetil-xatxilol	2,29
Epiendesmina	0,63
2-(benziloxi)-6,11-dimetoxi-1,2,3,4,12-hexahidronaftaceno	6,87
trimetiloctahidro-1-oxo-8-fenilnaftaleno-3,6,7-tricarboxilato	15,77
Estigmasta-5-en-3-ol	1,77
Ácido ursenóico	4,70

6 RESULTADOS

CAPÍTULO 3: FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS ATIVOS

Conforme os resultados dos ensaios biológicos realizados anteriormente, os extratos EDFBM e EEFBM foram selecionados para fracionamento cromatográfico.

6.6.8 Fracionamento e avaliação em CCD dos extratos EDFBM e EEFBM

Foram submetidos ao fracionamento por cromatografia em coluna 3,32 g do extrato EDFBM, utilizando-se como fase estacionária Sephadex-LH-20 e como fase móvel metanol. O fracionamento cromatográfico deu origem a 96 frações, reunidas conforme o perfil cromatográfico observado em CCD. A figura 34 exibe o rendimento de cada fração obtida.

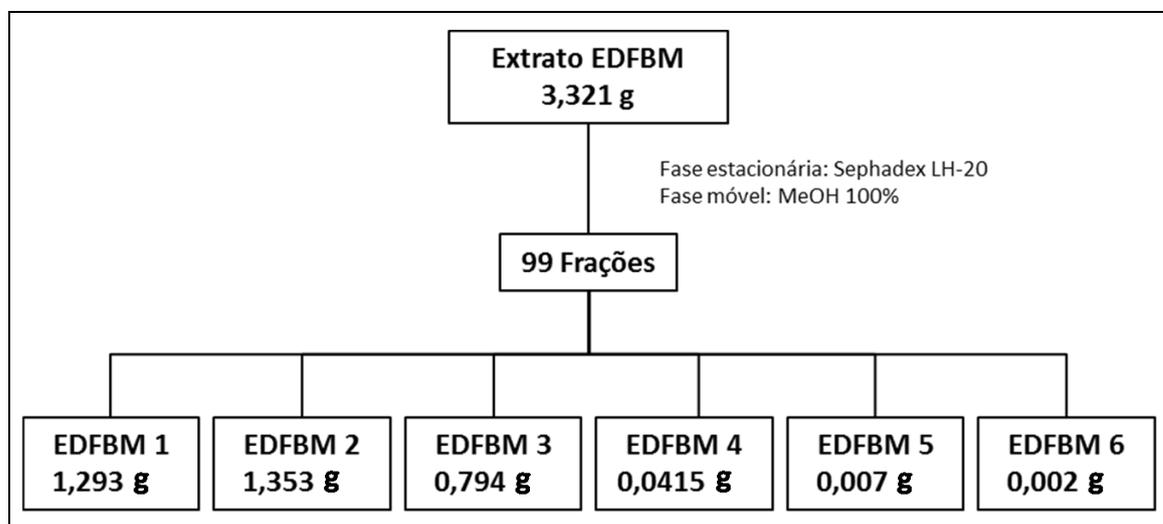


Figura 34. Fracionamento por coluna cromatográfica de EDFBM. **Fonte:** Elaborado pelo autor.

As frações foram avaliadas através de CCD com os mesmos reveladores químicos utilizados na avaliação dos extratos. Quando reveladas com vanilina sulfúrica as frações 2 e 3 apresentam bandas de coloração roxa, geralmente indicando a presença de compostos aromáticos. A revelação com NP/PEG indicou bandas de coloração laranja, quase vermelhas, indicando esses compostos aromáticos como flavonoides. Ainda, é possível notar a presença de compostos amarelos e fluorescentes nas frações 4, 5 e 6, indicando também a presença de compostos fenólicos (figura 35).

Ao serem reveladas com KOH, percebe-se bandas de fraca intensidade nas colorações vermelhas nas frações 2 e 3, justamente onde foram reveladas em NP/PEG bandas intensas de cor laranja. Por serem estruturas parecidas em sua constituição aromática é possível que o revelador KOH tenha se ligado a esses compostos flavonoides e apresentado uma baixa

intensidade, não indicando necessariamente a presença de antronas e antraquinonas nas referidas frações (figura 35).

A avaliação das frações de EDFBM em Dragendorff não indicou a presença de substâncias alcaloídicas nas frações, portanto, as frações 2 e 3 são possuidoras de elevada concentração de compostos aromáticos, que podem estar relacionados com a presença da atividade antimalárica desse extrato (figura 35). Tal hipótese deverá ser confirmada nos ensaios biológicos apresentados a seguir.

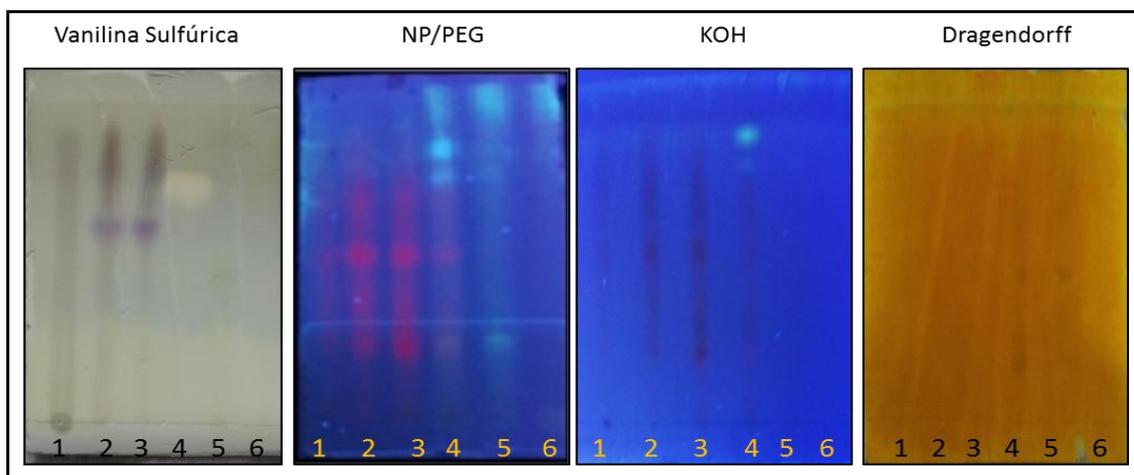


Figura 35. Avaliação por CCD das frações de EDFBM. **Fonte:** Elaborado pelo autor.

Foram submetidos ao fracionamento cromatográfico 7,31 g do extrato EEFBM, utilizando-se como fase estacionária Sephadex LH-20 e como fase móvel metanol. O fracionamento deu origem a 75 frações, as quais foram reunidas em cinco frações distintas, conforme exibido na figura 36.

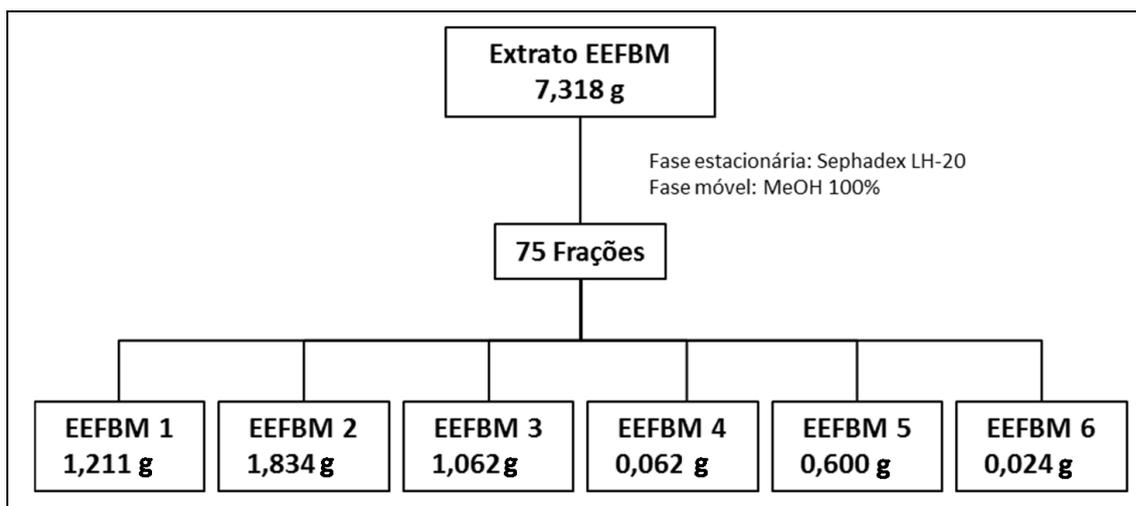


Figura 36. Fracionamento em coluna cromatográfica das frações de EEFBM. **Fonte:** Elaborado pelo autor.

Assim como as frações anteriores, as frações de EEFBM foram submetidas à avaliação por CCD. Aparentemente a fração cinco apresenta uma intensa coloração avermelhada quando revelada por NP/PEG, o que não representa substâncias da classe dos flavonóides quando nesta coloração. Portanto, é provável que tal composto se trate de compostos antraquinona, já visualizados na CCD de seu extrato bruto. A revelação das frações com vanilina sulfúrica não apresentaram a presença de nenhum composto nas condições cromatográficas utilizadas (figura 37).

A revelação da placa o revelador KOH indicou nas frações 4 e 6 a presença de compostos de coloração azul-esverdeada, indicando a presença de compostos de cumarina. Ainda, na fração 5 é possível notar a presença de uma banda de coloração roxa, que para tal revelador não possui um significado específico. Porém, é possível que tal banda se trate de composto avermelhado visualizado pela revelação por NP/PEG, é por estar presente em quantidade abundante, torna-se visível também por esse revelador.

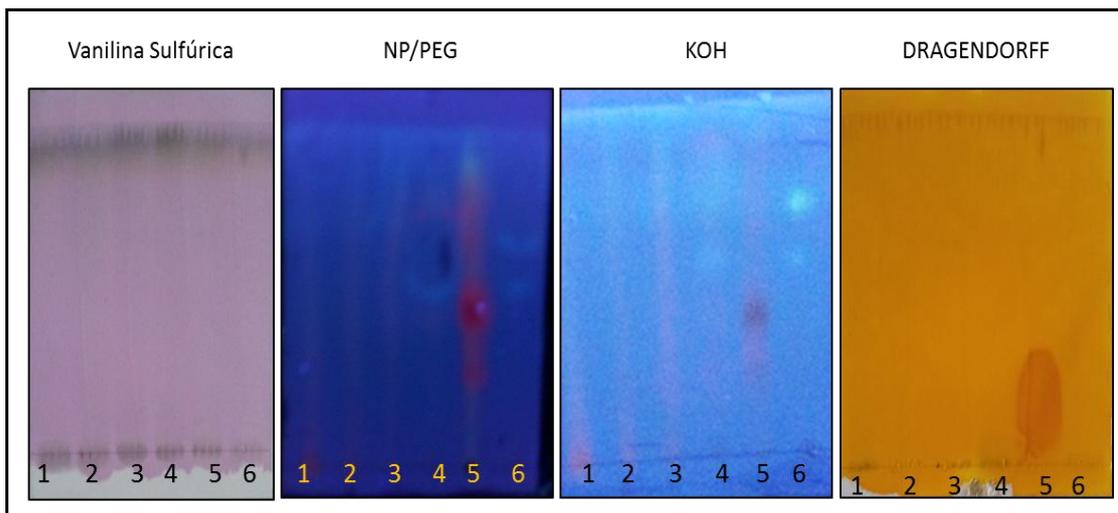


Figura 37. Avaliação por CCD das frações de EEFBM. **Fonte:** Elaborado pelo autor.

Assim sendo, foi possível identificar nos compostos 2 e 3 do extrato EDFBM e na fração 5 e 6 do extrato EEFBM a presença de algumas substâncias de classe química bioativa. É possível que tais compostos estejam relacionados a ação antimalárica exibida nos ensaios anteriores. Para que tal hipótese possa ser confirmada, as frações foram avaliadas individualmente em novos ensaios biológicos.

6.6.9 Avaliação biológica das frações obtidas dos extratos EDFBM e EEFBM

A avaliação de inibição de β -hematina indicou as frações 2 e 3 do extrato EDFBM como as mais ativas, resultado já esperado, visto o perfil cromatográfico observado por CCD.

As frações do extrato EEFBM apresentaram inibição relevante, mas diferentemente do extrato anterior, a maior inibição não se concentrou na fração 5, detentora do maior número de substâncias segundo avaliação por CCD. A figura 36 e a tabela 13 apresentam os resultados obtidos para as frações avaliadas desses extratos, sendo os mais promissores os que mais se aproximam dos valores expressos pelo controle positivo.

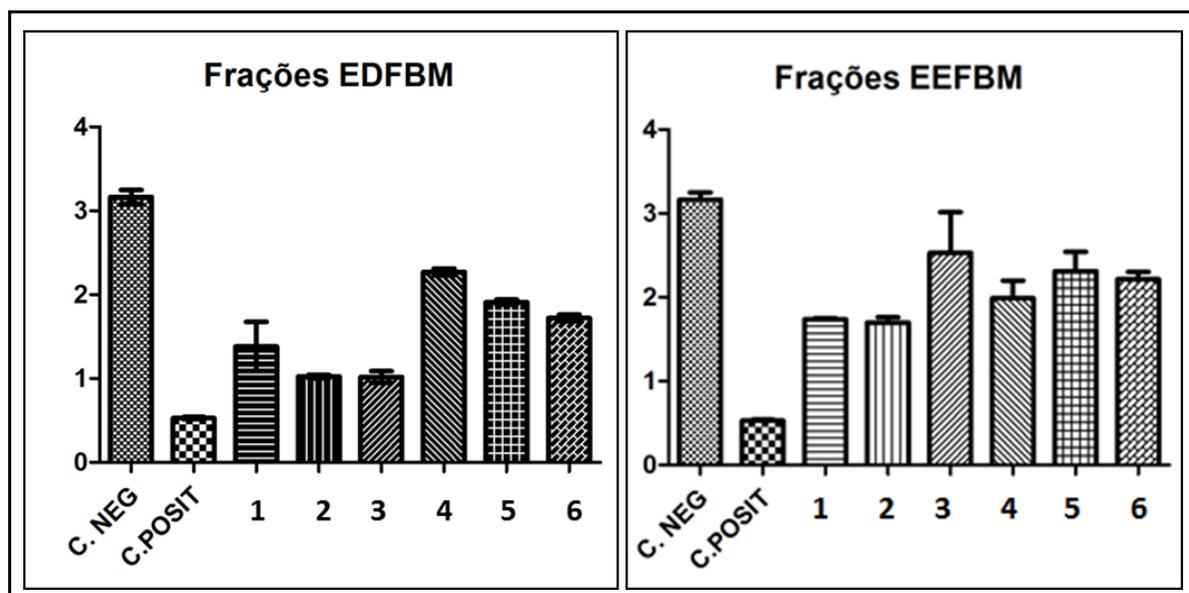


Figura 38. Avaliação da atividade inibitória de b-hematina das frações dos extratos EDFBM e EEFBM. **Fonte:** Elaborado pelo autor.

Tabela 14. Unidade de emissão de fluorescência das frações de EDFBM e EEFBM

Frações	EDFBM	EEFBM
1	1,381	1,737
2	1,026	1,699
3	1,018	2,533
4	2,270	2,528
5	1,912	1,987
6	1,721	2,213
Água (C.N.)	3,166	3,166
Cloroquina (C.P)	0,527	0,527

6.9.10 Ensaio Hemolítico das frações dos extratos EDFBM e EEFBM.

Apesar de já terem sido avaliados quanto a uma possível atividade hemolítica, as frações dos extratos foram novamente avaliadas com o mesmo intuito, e assim como em seus extratos brutos não apresentaram atividade hemolítica, conforme pode ser observado na figura 39.

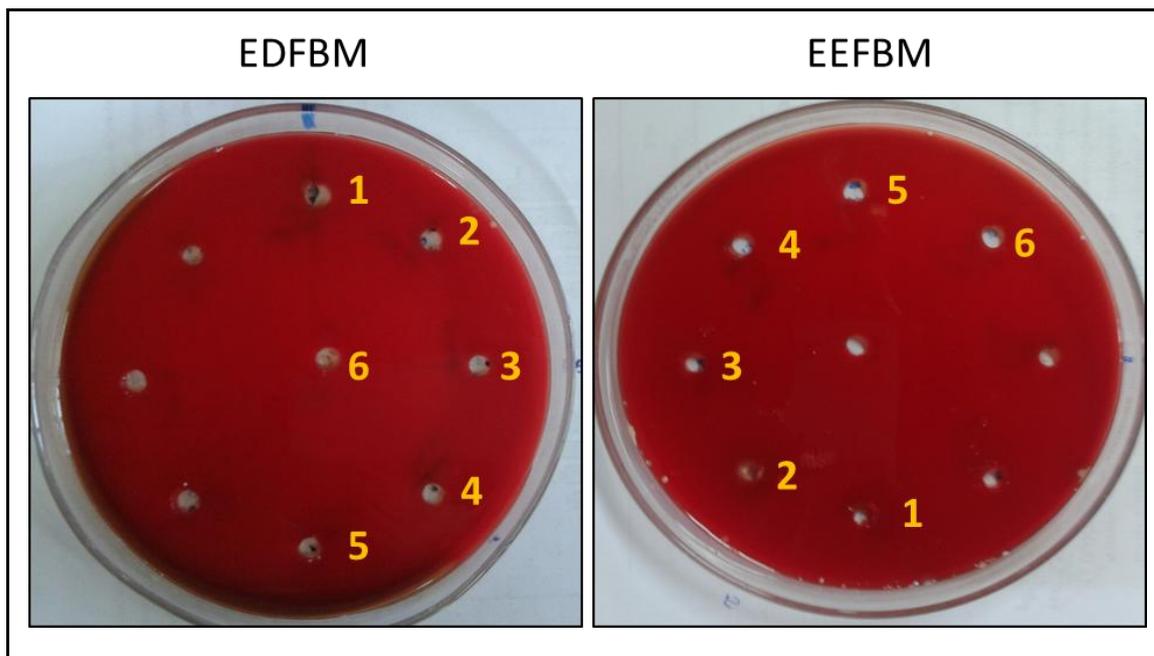


Figura 39. Avaliação hemolítica das frações de EDFBM e EEFBM. **Fonte:** Elaborado pelo autor.

7 CONCLUSÃO

Na busca por novas substâncias antimaláricas, algumas questões foram abordadas durante o desenvolvimento deste trabalho. A primeira delas foi o comportamento dos extratos obtidos frente aos solventes orgânicos administrados em organismos vivos. Ao todo, foram obtidos doze extratos vegetais de diferentes polaridades e parte das plantas estudadas. Desse total apenas sete foram solúveis em DMSO, mostrando-se mais propensas à avaliação biológica que os demais extratos, insolúveis à maioria dos solventes experimentados.

O segundo ponto observado por esse estudo foi a avaliação da capacidade desses extratos em inibir o crescimento parasitário *in vitro* de cepas resistentes e sensíveis à cloroquina. Dos sete extratos em que foi possível a formulação de soluções-teste, apenas quatro mostraram-se eficazes como inibidores do parasita causador da malária, sendo eles os extratos EDFBM, EEFBM EDCBP e EDCSG, apresentando estimativas de IC₅₀ entre 13 e 50µg/mL, o que os classifica como extratos portadores de atividade antimalárica moderada. É importante salientar que a escala de mensuração da atividade antimalárica é baseada na ação da substância padrão cloroquina. Portanto a atividade expressa por esses extratos tornam-se mais expressivos, uma vez que as substâncias presentes apresenta-se em uma concentração bem inferior em comparação com a concentração da droga controle, tornando necessária a sua avaliação dessas substâncias de maneira isolada. Ao evidenciar tal fato um dos objetivos deste trabalho se cumpre, na medida em que se identificou em extratos das três espécies avaliadas a presença de atividade antimalárica.

Nenhum dos extratos avaliados apresentou atividade hemolítica, indicando que os valores observados nos ensaios biológicos correspondem apenas à ação dos extratos sobre os parasitas, e não sobre as células sanguíneas, mostrando-se não tóxicas às células humanas. Demais avaliações a respeito do comportamento desses extratos em organismos vivos devem ser realizadas a fim de se estabelecer um critério de segurança quanto a sua administração organismos vivos.

O mecanismo de ação das substâncias antimaláricas foram avaliadas a partir de dois ensaios distintos, os quais simulam diferentes vias metabólicas do parasita. Os extratos EDFBM e EDCBP mostraram-se mais eficientes na inibição da formação de β-hematina, podendo-se inferir que os extratos são possuidores de substâncias que promovem a morte do parasita ao impedir que a polimerização do heme.

O extrato EEFBM apresentou baixa inibição de β-hematina, porém, sua maior atividade foi exibida no ensaio de inibição de HGRPTase, sendo o único extrato capaz de se

ligar a tal enzima e a permanecer ligado a ela durante determinado tempo.

Após identificados os extratos possuidores de atividade antimalárica, o estudo buscou identificar através de análises químicas e cromatográficas as substâncias presentes nesses extratos responsáveis por tal atividade. Em primeira instância os extratos foram avaliados através de CCD, e avaliados através de reveladores químicos específicos de classe orgânicas.

Os extrato EDFBM e EEFBM apresentaram em suas constituições substâncias de diferentes classes como flavonoides, antranas, antraquinonas e cumarinas, os quais apresentam relevância direta ou indireta na atividade em questão. O extrato EDCBP apresentou perfil cromatográfico diferenciado, evidenciando em sua constituição a presença de substâncias alcalóidicas e flavonoides, que juntos representam grande valor antimalárico, uma vez que alcalóides inibem o parasita intracelular enquanto os flavonoides podem diminuir o efeito do estresse oxidativos gerado pela doença e pela própria ação antimalárica. Por último, o extrato EDCSG revelou a apenas a presença majoritária de alcaloides, sendo provavelmente os responsáveis pela atividade antimalárica observado no ensaio *in vitro*.

Uma vez conhecida a classe química dos compostos presentes nesses extratos, as avaliações em CG-EM mostraram-se pouco eficientes na identificação dos constituintes que os foram, limitando-se a identificação de compostos apolares, a grande maioria terpenos. Ainda assim foi possível identificar substâncias importantes. No extrato EDCBP foi identificada a presença abundante do policarpol, descrito na literatura científica como composto possuidor de atividade parasitária contra filariose e doença de chagas. Baseado nisso, é provável que a atividade exibida por esse extrato esteja relacionada a esta substância, que segundo a literatura, é facilmente encontrado em espécies da família Annonaceae. Nos demais extratos diclorometânicos foram identificados a presença abundante de sesquiterpenos, muitos dos quais já descritos como possuidores de atividades biológicas, porém, nunca como antimaláricos.

O fracionamento dos extratos ativos EDFBM e EEFBM levaram, no caso do extrato EDFBM, à obtenção de duas frações com a presença de compostos fenólicos. A avaliação da atividade de inibição da β -hematina das frações obtidas de EDFBM, indicou atividade relevante para as frações enriquecidas de fenólicos. Em EEFBM, as frações 1 e 2 apresentaram inibição significativa do polímero de β -hematina apesar da menor eficiência quando comparado com o extrato EDFBM. Esse resultado já era esperado, uma vez que em avaliação de extrato bruto, o referido extrato mostrou-se mais eficiente ligando-se à enzima HGRPTase

do que inibindo a formação desse polímero. Entretanto, a atividade de inibição de β -hematina evidenciada por esse extrato apresenta relevância, indicando nas frações 1 e 2 a presença de substâncias capazes de promover tal ação. A análise por CCD dessas frações não evidenciou a presença de nenhuma classe química, sugerindo que novas análises químicas sejam realizadas a fim de se identificar a classe desses compostos presentes nessas frações.

A malária é uma doença presente há milênios e atualmente representa a causa da morte de milhares de pessoas. O presente trabalho contribui com a investigação de novas substâncias capazes de impedir o desenvolvimento da malária em seres humanos nas cascas e folhas das espécies *B. multiflora*, *B. pleiosperma* e *S. glyycarpa*. Estudos mais elaborados sobre caracterização, mecanismos de ação e disponibilidade dessas substâncias deverão ser realizados, para que tais substâncias possam ser utilizadas como matéria prima de novos agentes antimaláricos, aumentando assim as alternativas terapêuticas dos já escassas no mercado atual. Além disso, se pode contatar a flora amazônica como provedora de substâncias capazes de curar uma série de enfermidades, inclusive da malária.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R. P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry**. 4th ed. New York: Hardcover, 2007.

AMARANTE, C. B.; MULLER, A. H.; PÓVOA, M. M.; DOLABELA, M. F. Estudo fitoquímico biomonitorado pelos ensaios de toxicidade frente à *Artemia salina* e de atividade antiplasmódica do caule de aninga (*Montrichardia linifera*). **Acta Amazônica**, v. 41, n. 03, p. 431-434, 2011.

ANTINORI, S.; GALIMBERTI, L.; MILAZZO, L.; CORBELLINO, M. Biology of Human Malaria Plasmodia Including *Plasmodium Knowlesi*. **Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases**, v. 4, n. 1, 2012. DOI: 10.4084/MJHID.2012.013

BAIRD, J. KEVIN. Neglect of *Plasmodium vivax* malaria. **Trends in Parasitology**, v. 23, n. 11, p. 533 – 539, 2007. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2007.08.011>.

BALENDIRAN, G. P.; MOLINA, J. L.; XU, Y.; TORRES-MARTINEZ, J.; STEVENS, R.; FOCIA, P. J.; EAKIN, A. E.; SACCHETTINI, J. C.; CRAIG III, S. P. Ternary complex structure of human HGPRase, PRPP, Mg21, and the inhibitor HPP reveals the involvement of the flexible loop in substrate binding. **Protein Sciences**, v. 8, p.1023–1031, 1999.

BARROS, H. L. C. **Química orgânica** – Uma introdução. 1ª ed. Minas Gerais: Editora UFMG, 1992.

BOTSARIS, A. Plants used traditionally to treat malaria in Brazil: the archives of Flora Medicinal. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 3, n. 18, 2007. DOI:10.1186/1746-4269-3-18

BOYOM, F. F.; NGOUANA, V.; KEMGNE, E. A. M.; ZOLLO, P. H. A.; MENUT, C.; BESSIERE, J. M.; GUT, J.; ROSENTHAL, P. J. Antiplasmodial volatile extracts from *Cleistopholis patens* Engler & Diels and *Uvariastrum pierreanum* Engl. (Engl. & Diels) (Annonaceae) growing in Cameroon. **Parasitol Research**, v.108, n. 5, p.1211–1217, 2011. DOI: 10.1007/s00436-010-2165-7

BRASIL. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA/ MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Boletim Epidemiológico**: Situação Epidemiológica no Brasil, 2000 a 2011. v. 44, n.1, 2013.

BUCHANAN, W. GRUISSEM, R. JONES. Biochemistry & Molecular Biology of Plants. **American Society of Plant Physiologists**, v. 23, n. 2, 2005.

CANTRELL, C. L.; KLUN, J. A.; BRYSON, C. T.; KOBASISY, M.; DUKE, S. O. Isolation and Identification of mosquito bite deterrent terpenoids from Leaves of American (*Callicarpa americana*) and Japanese (*Callicarpa japonica*) Beautyberry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 15, 2005.

CHATROU, L. W.; ESCRIBANO, M. P.; VIRUEL, M. A.; MAAS, J.W.; RICHARDSON, J.E.; HORMAZA, J. I. Flanking regions of monomorphic microsatellite loci provide a new

source of data for plant species-level phylogenetics. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 53, n. 3, 2009. DOI:10.1016/j.ympev.2009.07.024

CONSOLI, R. A. G. B.; LOURENÇO, R. O. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1994.

COLLINS, W. E.; JEFFERY, J. A. *Plasmodium malariae*: Parasite and Disease. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 20, n. 4. 2007. DOI: 10.1128/CMR.00027-07

COLLINS, W. E.; JEFFERY, J. A. *Plasmodium ovale*: Parasite and Disease. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 21, n. 3. 2005. DOI: 10.1128/CMR.18.3.570-581.2005.

COSTA, F. N.; GARRARD, I.; SILVA, A. J. R.; LEITÃO, G. G. Changes in the mobile phase composition on a stepwise counter-current chromatography elution for the isolation of flavonoids from *Siparuna glycyarpa*. **Journal of Separation Science**, v. 36, n. 14, pg. 2253-2259, 2013. DOI: 10.1002/jssc.201201054.

COUVREUR, T. L. P.; PIRIE, M. D.; CHATROU, L. W.; SAUNDERS, R. M. K.; SU, Y. C. F.; RICHARDSON, J. E.; ERKENS, R. H. J. Early evolutionary history of the flowering plant family Annonaceae: steady diversification and boreotropical geodispersal. **Journal of Biogeography**, v. 38, n. 04, 2011. DOI: 10.1111/j.1365-2699.2010.02434.x

COX, F. E. G. History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. **Parasites & Vectors**. Londres: v. 3, n.15, 2010. DOI: 10.1186/1756-3305-3-5

DELVES, M.; PLOUFFE, D.; SCHEURER, C.; MEISTER, S.; WITTLIN, S.; WINZELER, E. A.; SINDEN, R. E.; LEROY, D. The Activities of Current Antimalarial Drugs on the Life Cycle Stages of *Plasmodium*: A Comparative Study with Human and Rodent Parasites. **PLoS Medicine**, v. 09, n 2, 2012.

DI STASI, L.C.; HIRUMA-LIMA, C.A. **Plantas Mediciniais na Amazônia e na Mata Atlântica**. São Paulo: UNESP, 2002.

FRANÇA, T. C. C.; SANTOS, M. G.; FIGUEROA-VILLAR, J. D. Malária: aspectos históricos e quimioterapia. **Química Nova**, v. 31, n.5, p. 1271-1278, 2008.

GE HEALTHCARE. **Biacore Concentration Analysis Handbook BR-1005-12**. Ed. ition AAB. 2013. Disponível em <http://labs.idi.harvard.edu/springer/uploads/Equipment>

GILLIJ, Y. G.; GLEISER, A.; ZYGADLO, J. A. Mosquito repellent activity of essential oils of aromatic plants growing in Argentina. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 2507–2515, 2008.

GOLAN, D. E.; TASHJIAN, J. R.; ARMSTRONG, A. H.; ARMSTRONG, E. J. **Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

GOLDBERG, D. E.; SLATER, A. F. G.; CERAMI, A.; HENDERSON, G.B. Hemoglobin degradation in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*: An ordered process in a unique organelle. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of**

America, v. 87110, n. 14, 2013. Disponível em: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073

HASTINGS, I. M.; DONNELLY, M. J. The impact of antimalarial drug resistance mutations on parasite fitness, and its implications for the evolution of resistance. **Drug Resistance Updates**, v. 8, p. 43-50, 2005. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.drug.2005.03.003>

HIRSCH, H. V.; BECKER, N. Cost-benefit analysis of mosquito control operations based on microbial control agents in the upper Rhine valley (Germany). **The Journal of the European Mosquito Control Association** , v.27, 2009.

HONG, J. Role of natural product diversity in chemical biology. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 15, n. 3, p. 350-354, 2011. DOI:10.1016/j.cbpa.2011.03.004.

HYDE, J. E. Drug-resistant malaria - an insight. **Federation of European Biochemical Societies**, v. 274, n.18, p. 4688-99, 2007. DOI:10.1111/j.1742-4658.2007.05999.x.

JIMÉNEZ, V. M.; GRUSCHWITZ, M.; SCHWEIGGERT, R. M.; CARLE, R.; ESQUIVEL, P. Identification of phenolic compounds in soursop (*Annona muricata*) pulp by high-performance liquid chromatography with diode array and electrospray ionization mass spectrometric detection. **Food Research International**, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2014.05.051>

JOLY, A. B. **Botânica**: Introdução à taxonomia vegetal. 4ª ed. São Paulo: Editora Nacional, 1993.

JOLY, C. A.; HADDAD, C. F. B.; VERDADE, L. M.; OLIVEIRA, M. C.; BOLZANI, V. S.; BERLINCK, R. G. S. Diagnóstico da pesquisa em biodiversidade no Brasil. **Revista USP**, n.89,2011.

KANTELE, A.; JOKIRANTA, T. S. Review of Cases With the Emerging Fifth Human Malaria Parasite, *Plasmodium knowlesi*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 52, n. 11, 2013. DOI: 10.1093/cid/cir180

KINGSTON, D. G. I. Modern Natural Products Drug Discovery and Its Relevance to Biodiversity Conservation. **Journal of Natural Products**, v. 74, n. 3, 2010. DOI: 10.1021/np100550t

LANFER-MARQUEZ, U. M. O papel da clorofila na alimentação humana: uma revisão. **Brazilian Journal of Medical and Biological** , v 39, n. 3, 2003. Disponível em <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-93322003000300003>

LEBOEUF, M.; CAVÉ, A.; BHAUMIK, P. K.; MUKHERJEE, B.; MUKHERJEE, R. The phytochemistry of the ANNONACEAE. **Phytochemistry**, v. 21, n. 12, p. 2783-2813, 1982. DOI: 10.1016/0031-9422(80)85046-1

LEITÃO, G. G.; SIMAS, N. K.; SOARES, S. S.V.; BRITO, A. P. P.; CLAROS, B. M. G.; BRITO, T. B. M.; MONACHE, F. D. Chemistry and pharmacology of Monimiaceae: a special focus on *Siparuna* and *Mollinedia*. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 65, p. 87-102, 1999. DOI: 10.1016/S0378-8741(98)00233-5.

LIMA, E. S., ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação de amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 37, n. 3, 2001.

MAAS, P. J. M.; LUBBERT, Y.T.H.; WESTRA, V.; MARLOES, V. Revision of the neotropical genera *Bocageopsis*, *Onychopetalum*, and *Unonopsis* (ANNONACEAE). **BLUMEA**, v.52, n.3, p. 413-554, 2007. Disponível em <http://www.ingentaconnect.com/content/nhn/blumea/2007/00000052/00000003/art00001>

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C. P.; VEIGA JR, V. F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n.3, p. 429-438, 2002. Disponível em <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422002000300016>.

MENDIS, K.; SINA, B. J.; MARCHESINI, P.; CARTER, R. The neglected burden of *Plasmodium vivax* malaria. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 64, n. 2, p. 97-106, 2001.

MINISTERIO DA SAÚDE BRASIL. MINISTÉRIOS DA SAÚDE. Doenças negligenciadas: estratégias do Ministério da Saúde. **Revista de Saúde Pública**, v. 44, n. 1, p. 200-202, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rsp/v44n1/23.pdf> 2010;44(1):200-2

MUHAMAD, P.; CHAIJAROENKUL, W.; PHOMPRADIT, P.; RUEANGWEERAYUT, R.; TIPPAWANGKOSOL, P.; NA-BANGCHANG, K. Polymorphic patterns of *PFCRT* and *PFMDR1* in *Plasmodium falciparum* isolates along the Thai-Myanmar border. **Asian Pacific Journal Tropical Biomedicine**, v. 3 n. 12, p. 931-935, 2013. DOI: 10.1016/S2221-1691(13)60181-1

MUNIZ, J. W. C.; BOZZA, P. T.; DO NASCIMENTO, J.L.M.; REIS, P. A. Atividade anti-inflamatória do óleo-resina da *Copaifera reticulata* em modelo inflamatório de edema de pata. **Revista Paraense de Medicina**, 2009.

NEVES, D. P. **Parasitologia humana**. Atheneu, 2011.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 03, 2012. DOI:10.1021/np200906s

NGANTCHOU, I.; NKWENGOUA, E.; NGANSO, Y.; NYASSE, B.; DENIER, C.; HANNAERT, V.; SCHNEIDER, B. Antitrypanosomal activity of polycarpol from *Piptostigma preussi* (Annonaceae). **Fitoterapia**, v. 80, n. 3, p. 188-191, 2009. DOI:10.1016/j.fitote.2009.01.008

NYASSE, B.; NGANTCHOU, I.; NONO, J. J.; SCHNEIDER, B. Antifilarial activity in vitro of polycarpol and 3-O-acetyl aleuritic acid from Cameroonian medicinal plants against *Onchocerca gutturosa*. **Natural Product Research**, v. 20, n. 4, p. 391-397, 2006. DOI: 10.1080/14786410600661377

O'NEILL, P. M.; BRAY, P. G.; HAWLEY, S. R.; WARD, S. A.; PARK, B. K. Aminoquinolines-past, present and future: A chemical perspective. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 7, p. 29-58, 1998. DOI: 10.1016/S0163-7258(97)00084-3

OKOKON, J. E.; NWAFOR, P. A.; NOAH, K. Nephroprotective effect of *Croton zambesicus* root extract against gentamicin-induced kidney injury. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 4, n. 12, 2011. DOI: 10.1016/S1995-7645(11)60228-9

OLIVEIRA, A. R. M.; SZCZERBOWSKI, D.; Quinina: 470 anos de história, controvérsias e desenvolvimento. **Química Nova**, v. 32, n. 7, p. 1971-1974, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422009000700048>

OLIVEIRA, E. S. C.; AMARAL, A. C. F.; LIMA, E. S.; SILVA, J. R. A. Chemical composition and biological activities of *Bocageopsis multiflora* essential oil. **The Journal of Essential Oil Research**, v. 26, n. 3, 2013. Disponível em <http://dx.doi.org/10.1080/10412905.2013.840809>

OLIVEIRA-FERREIRA, J.; LACERDA, M. V. G.; BRASIL, P.; LADISLAU, J. L. B.; OLOYEDE, G. K.; OLADOSU, I. A.; SHODIA, A. F. Chemical composition and cytotoxicity of the essential oils of *Crinum ornatum* (Ait.) Bury. **African Journal of Pure and Applied Chemistry**. v. 4, p. 35-37, 2010. Disponível em: <http://www.academicjournals.org/AJPAC>

PHILIPSON, W. R. MONIMIACEAE. In: K. KUBITZKI. **The Families and Genera of Vascular Plants**. . Springer, v. 2, p. 426-437, 1993.

PINK, R.; HUDSON, A.; MOURIÈS, MARIE-ANNICK.; BENDIG, M. Opportunities and Challenges in Antiparasitic Drug Discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, p. 727-740, 2005. DOI: 10.1038/nrd1824

PIO-CORRÊA, M. **Dicionários das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Ministério da Agricultura. Rio de Janeiro, p. 1984-314, 1984.

POSNER, G. H.; PARKER, M. H.; NORTHTOP, J.; ELIAS, J. S.; PLOYPRADITH, P.; XIE, S.; SHAPIRO, T. A. Orally Active, Hydrolytically Stable, Semisynthetic, Antimalarial Trioxanes in the Artemisinin Family. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 42, n. 2, p. 1999. DOI: 10.1021/jm980529v

RADFAR, A.; DIEZ, A.; BAUTISTA, J. M. Chloroquine mediates specific proteome oxidative damage across the erythrocytic cycle of resistant *Plasmodium falciparum*. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 44, p. 2034-2042, 2008. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.03.010

RAMOS, J. M. O.; SANTOS, C. A.; SANTANA, D. G.; SANTOS, D. A.; ALVES, P. B.; THOMAZZI, S. M. Chemical constituents and potential antiinflammatory activity of the essential oil from the leaves of *Croton argyrophyllus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 04, p. 644-650, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2013005000045>

RENNER, S.S. **Laurales**. Complement, Post-C3 (Lytic) Pathway-Encyclopedia of Life Sciences. St. Louis US: Macmillan Reference Ltd, 1997. Encyclopedia of Life Sciences. 1997.

RIBEIRO, J. E. L. S.; HOPKINS, M. J. G.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C. A.; COSTA, M. A. S.; BRITO, J. M.; SOUZA, M. A. D.; MARTINS, L. H. P.; LOHMANN, L. G.; ASSUNÇÃO, P. A. C. L.; PEREIRA, E. C.; SILVA, C. F.; MESQUITA, M. R.; PROCÓPIO,

L. C. **Flora da Reserva Ducke**: Guia de Identificação das Plantas Vasculares de uma Floresta de Terra-firme na Amazônia Central. DFID (Departamento Internacional de Desenvolvimento), Manaus: Ed. INPA, p. 816, 1999-AM. INPA, p. 816, 1999.

RICH, S. M.; LEENDERTZ, F. H.; XU, G.; LEBRETON, M.; DJOKO, C. F.; AMINAKE, M. N.; TAKANG, E. E.; DIFFO, J. L. D. F.; PIKE, B. L.; ROSENTHAL, B. M.; FORMENTY, P.; BOESCH, C.; AYALA, F. J.; WOLFE, N. D. The origin of malignant malaria. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** Early Edition, 1999. Disponível em www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0907740106

SÁ, I. M.; A resistência à cloroquina e a busca de antimalaríais entre as décadas de 1960 e 1980. **História, Ciências, Saúde – Manguinhos**, Rio de Janeiro: v.18, n.2, p. 407-430, 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/hcsm/v18n2/08.pdf>

SANGYEON, C.; KIM, S.; KIM, Y.; PARK, Y. Optical imaging techniques for the study of malaria. **Trends Biotechnology**, v.30, n.2, 2012. DOI: 10.1016/j.tibtech.2011.08.004.

SCHMIDT, T.J. Toxic activities of sesquiterpene lactones: Structural and biochemical aspects. **Current Opinion in Chemical Biology**, v.3, n. 6, p.577-608, 1999.

SILVA, J. A. C.; SILVA, M. F. Estudos florísticos no município de Presidente Figueiredo, Amazonas, Brasil – II: famílias Myristicaceae, Siparunaceae e Monimiaceae. **Acta Amazônica**, v. 38, n. 02, pg. 207-212, 2008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0044-59672008000200003>

SILVA, T. H. A.; OLIVEIRA, M. T.; SANTOS, H. F.; OLIVEIRA, A. B.; ALMEIDA, W. B. Estudo de modelagem molecular de complexos ferriprotoporfirina-IX e quinolinocarbinolaminas antimaláricas: proposta de um farmacoforo. **Química Nova**, v. 28, n.2, p. 244-249, 2005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422005000200015>

SIMÕES, C. M. O. **Farmacogonosia**: da planta ao medicamento. Editora da UFSC, 5ª Edição, 1999.

SULLIVAN, D. J. Theories on malarial pigment formation and quinoline action. **International Journal of Parasitology**, v. 32, p. 1645–1653, 2002. DOI: 10.1016/S0020-7519(02)00193-5

TEMPONE, A. G.; TREIGER BORBOREMA, S. E.; DE ANDRADE JR, H. F.; AMORIM, N. C.; GUALDA; YOGI, A.; SALERNO CARVALHO, C.; BACHIEGA, D.; LUPO, F.N.; BONOTTOC, S.V.; FISCHER, D.C.H. Antiprotozoal activity of Brazilian plant extracts from isoquinoline alkaloid-producing families. **Phytomed**, v.12, n. 5, p. 382–390, 2005. DOI: 10.1016/j.phymed.2003.10.007

TRAGER, W.; JENSEN, J.B. Human malaria parasites in continuous culture. **Science**, v. 193, p. 673-675, 1976. DOI:10.1126/science.781840

TRAVASSOS, M. A.; LAUFER, M. K. Resistance to Antimalarial Drugs: Molecular, Pharmacologic, and Clinical Considerations. **Journal of Pediatric Research**, Baltimore: v. 65, n.5, 2009. DOI:10.1203/PDR.0b013e3181a0977e.

TSABANG, N.; FOKOU, P. V. T.; TCHOUKOUAHA, L. R. Y.; NOGUEM, B.;

BAKARNGA-VIA, I.; NGUEPI, M. S. D.; NKONGMENECK, N. A.; BOYOM, F. F. Ethnopharmacological survey of Annonaceae medicinal plants used to treat malaria in four áreas of Cameroon. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, p. 171-180, 2012. DOI: 10.1016/j.jep.2011.10.035

VALADARES, N. F. **Receptores dos hormônios da tireoide: estudos computacionais, ressonância plasmônica de superfície e ensaios celulares**. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, 176 p, 2009.

VALENTINI, C.M.A.; RODRÍGUEZ-ORTÍZ, C.E.; COELHO, M.F.B. *Siparuna guianensis* Aublet (negramina): uma revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 1, p. 96-104, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-05722010000100014>

WAGNER, H. **Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas**. Springer Science & Business Media, 1996.

WHITE, N. J. Antimalarial drug resistance. **Journal of Clinical Investigation**, n. 113, p. 1084–1092, 2004. DOI:10.1172/JCI21682.

WILLCOX, M. L.; GRAZ, B.; FALQUET, J.; DIAKITE, C.; GIANI, S.; DIALLO, D. A “reverse pharmacology” approach for developing an anti-malarial phytomedicine. **Malar Journal**, v. 10, 2011. Disponível em <http://www.malariajournal.com/content/10/S1/S8>

WINK, M. Medicinal Plants: A Source of Anti-Parasitic Secondary Metabolites. **Molecules**, Heidelberg: n.17, p. 12771-12791, 2012. DOI:10.3390/molecules171112771

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global report on antimalarial drug efficacy and Drug Resistance: 200-2010**. Library Cataloguing, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for the treatment of malaria**. 2^a Ed. WHO Library Cataloguing, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World malaria report: 2012**. WHO Library Cataloguing, 2013.

YIGIT, N.; AKTAS, E. Comparison of the efficacy of different blood medium in determining the hemolytic activity of *Candida* species. **Journal of Medical Mycology**, v, 19, p. 110–115, 2009. DOI: 10.1016/j.mycmed.2009.03.005

YOUYOU, T.; The discovery of artemisinin (qinghaosu) and gifts from Chinese medicine. **Nature Medicine**, v. 17, n. 10, 2011. DOI:10.1038/nm.2471