



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
BIOTECNOLOGIA



**ATIVIDADE ANTIMALÁRICA *IN VITRO* DE EXTRATOS, FRAÇÕES E  
SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE DUAS ESPÉCIES VEGETAIS DA AMAZÔNIA**

LAÍS GARCIA JORDÃO

MANAUS – AM

2018

LAÍS GARCIA JORDÃO

**ATIVIDADE ANTIMALÁRICA *IN VITRO* DE EXTRATOS, FRAÇÕES E  
SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE DUAS ESPÉCIES VEGETAIS DA AMAZÔNIA**

Dissertação apresentada ao Programa Multi-  
institucional de Pós-Graduação em  
Biotecnologia da Universidade Federal do  
Amazonas, para obtenção do título de Mestre  
em Biotecnologia, na área de concentração:  
Biotecnologias para a Saúde.

ORIENTADOR: DR. ADRIAN MARTIN POHLIT

COORIENTADORA: DRA. ZELINA ESTEVAM DOS SANTOS TORRES

MANAUS – AM

2018

## Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

J82a Jordão, Laís Garcia  
Atividade antimalárica in vitro de extratos, frações e substâncias isoladas de duas espécies vegetais da Amazônia / Laís Garcia  
Jordão . 2018  
61 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Adrian Martin Pohlit  
Coorientadora: Zelina Estevam dos Santos Torres  
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Aspidosperma excelsum. 2. Bertholletia excelsa. 3. carapanaúba. 4. castanha-do-brasil. 5. malária. I. Pohlit, Adrian Martin. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

LAÍS GARCIA JORDÃO

**ATIVIDADE ANTIMALÁRICA *IN VITRO* DE EXTRATOS, FRAÇÕES E  
SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE DUAS ESPÉCIES VEGETAIS DA AMAZÔNIA**

Dissertação apresentada ao Programa Multi-institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia, na área de concentração: Biotecnologias para a saúde.

Aprovada em 28 de agosto de 2018.

**BANCA EXAMINADORA**

Dr. Adrian Martin Pohlit, Presidente  
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA

Dra. Cecília Verônica Nunez, Membro  
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA

Dra. Stefanie Costa Lopes, Membro  
Instituto Leônidas & Maria Deane – ILMD / Fiocruz Amazônia

*Com todo o amor do mundo dedico às minhas  
mãezinhas Anízia e Valcilene, e à minha filha  
Evelyn, meu porto seguro.*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, que me permitiu mais esta conquista e me sustentou nos momentos mais difíceis;

A minha família, por todo o apoio, incentivo e compreensão. A minhas mãezinhas, irmãos, tios e primos que sempre estiveram torcendo por mim. Ao meu esposo e minha filha que estiveram ao meu lado em todos os momentos, perdão pelas ausências e obrigada pela paciência e dedicação;

Ao professor Dr. Adrian Martin Pohlit, pela orientação neste trabalho, pela paciência, disponibilidade, por todo o apoio e incentivo, e pela grande contribuição na minha formação;

À Dra. Zelina Torres, pela coorientação, paciência e disponibilidade;

Aos amigos Edizon Veiga, Diana Sangama e Marlene Camargo, pela colaboração, apoio, disponibilidade e amizade, vocês são pessoas incríveis;

À Márcia Alves e Jaqueline Siqueira, que me acolheram no Laboratório de Cultivo de *P. falciparum* e me ensinaram a doce missão de cultivá-los, obrigada pela paciência, amizade e confiança;

Ao professor Dr. Valter Andrade Neto, sempre solícito nos momentos de dificuldade, obrigada pelas aulas, pelos conselhos, pela amizade e pela imensa contribuição na minha formação;

À professora Dra. Marne Vasconcellos e a doutoranda Ellen Pereira pela parceira nos ensaios de citotoxicidade;

Aos amigos do LAPAAM que estiveram comigo nos dias difíceis e nas muitas alegrias vividas, Edizon Veiga, Diana Sangama, Marlene Camargo, Jaqueline Siqueira, Abraão Alexandre, Bruna de Oliveira, Gustavo Santos, Tiago Pereira, Dilcindo Barros, Berna Souza, Yara Lins, Paula Suellen e Rita Cynara, obrigada pelos almoços e cafés animados, e por todos os momentos compartilhados;

Aos amigos da graduação e do mestrado que me ajudaram em tantos momentos, Sabrina Meireles, Jéssica Rany, Bruno Jensen, Ralyvan Araújo e Carlos Eduardo, obrigada pelo apoio, conselhos e pelas alegrias compartilhadas;

À Universidade Federal do Estado do Amazonas (UFAM) e ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), onde este trabalho foi desenvolvido;

Aos órgãos de fomento, CNPq e FAPEAM, pelo financiamento deste projeto e da bolsa de mestrado;

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, não existem palavras suficientes para expressar toda a minha gratidão.

*“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos no mínimo fará coisas admiráveis.”*

*José de Alencar*

## RESUMO

A malária continua sendo uma das principais doenças infecciosas do mundo. A propagação de cepas de *Plasmodium* resistentes às terapias disponíveis tem ameaçado as medidas de controle da doença, que tem registrado aumento no número de casos. Na busca por terapias mais eficazes no combate à doença, as plantas utilizadas na medicina tradicional vêm sendo investigadas, uma vez que as substâncias que originaram os atuais antimaláricos foram isoladas de plantas medicinais. O presente trabalho é uma investigação da atividade antimalárica *in vitro* de extratos de castanheira (*Bertholletia excelsa* Bonpl.), frações e alcaloides indólicos isolados de carapanaúba (*Aspidosperma excelsum* Benth.), em uma busca por potenciais antimaláricos. Os extratos de *B. excelsa* foram preparados a partir de resíduos de plantações do município de Itacoatiara-AM por maceração em solventes orgânicos e em água. O extrato metanólico das cascas, bem como as frações e os alcaloides isolados a partir do extrato metanólico da casca de *A. excelsum* foram doados de um projeto de doutorado na área de química de produtos naturais no LAPAAM (Laboratório de Princípios Ativos da Amazônia). A atividade antimalárica foi avaliada através do microteste *in vitro*, utilizando culturas sincrônicas da cepa K1 (resistente à cloroquina) de *Plasmodium falciparum*. Para estimar a seletividade, avaliou-se a toxicidade *in vitro* das substâncias frente a uma linhagem normal de fibroblastos humanos (MRC-5), através do bioensaio Alamar Blue. Foram preparados setenta extratos de *B. excelsa*, submetidos a uma triagem inicial para classificação da atividade antimalárica; destes, os extratos metanólicos apresentaram melhores rendimentos e o extrato etanólico da casca do caule apresentou melhor atividade antiplasmódica, com  $CI_{50} < 1,00 \mu\text{g/mL}$ , estando aqui relatada também a atividade antiplasmódica das raízes e dos galhos da planta. Para *A. excelsum* foram avaliados o extrato metanólico da casca ( $CI_{50} 5,24 \mu\text{g/mL}$ ), quatro frações enriquecidas em alcaloides e oito alcaloides indólicos ( $CI_{50} 10,3 - 78,9 \mu\text{M}$ ) contra *P. falciparum*, apresentando ainda baixa toxicidade frente a fibroblastos humanos.

Palavras chaves: *Aspidosperma excelsum*; *Bertholletia excelsa*; carapanaúba; castanha-do-brasil; malária.

## ABSTRACT

Malaria remains one of the world's leading infectious diseases, the spread of *Plasmodium* strains resistant to available therapies has threatened disease control measures, which have seen an increase in cases. In the search for more effective therapies to combat the disease, plants used in traditional medicine have been investigated, since the substances that originated the current antimalarials were isolated from medicinal plants. The present work is an investigation of the *in vitro* antimalarial activity of extracts of the Brazil nut tree (*Bertholletia excelsa* Bonpl.), fractions and indole alkaloids isolated from carapanaúba (*Aspidosperma excelsum* Benth.), in a search for potentially new antimalarials. *B. excelsa* extracts were prepared from residual materials from plantations in the municipality of Itacoatiara, Amazonas State, by maceration in organic solvents and water. The methanol extract of the bark, as well as fractions and alkaloids isolated from the methanolic extract of the *A. excelsum* bark were donated by a doctoral student project in the area of natural products chemistry at LAPAAM (Amazon Active Principles Laboratory). The antimalarial activity was evaluated using the *in vitro* microtest using synchronized cultures of the K1 strain (resistant to chloroquine) of *Plasmodium falciparum*. To evaluate selectivity, the *in vitro* toxicity of substances to a normal human fibroblast lineage (MRC-5) was evaluated using the Alamar Blue bioassay. Seventy extracts of *B. excelsa* were prepared and submitted to an initial screening to classify antimalarial activity. Of these, the methanol extracts exhibited better yields and the ethanol extract of the stem bark showed better activity, with  $IC_{50} < 1.00 \mu\text{g/mL}$ , and the antiplasmodial activity of the roots and branches of the plant is also reported here. For *A. excelsum*, the methanol extract of the bark ( $IC_{50} 5.24 \mu\text{g/mL}$ ), four alkaloid-enriched fractions and eight indole alkaloids ( $IC_{50} 10.3\text{-}78.9 \mu\text{M}$ ) were evaluated against *P. falciparum*, with low toxicity against human fibroblasts.

Key words: *Aspidosperma excelsum*; *Bertholletia excelsa*; carapanaúba; Brazil nuts; malaria.

## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Figura 1: Ciclo de vida do parasita no hospedeiro .....  | 17 |
| Figura 2: Ciclo de vida do parasita no vetor.....  | 18 |
| Figura 3: Casos de malária notificados na região amazônica de janeiro a junho de 2017 e 2018. .... | 19 |
| Figura 4: Estrutura do quinina e análogos sintéticos.....  | 20 |
| Figura 5: Estrutura da artemisinina e seus derivados .....   | 20 |
| Figura 6: Países que notificaram resistência de <i>P. falciparum</i> às TCAs.....                  | 22 |
| Figura 7: Substâncias encontradas em <i>B. excelsa</i> .....                                       | 29 |
| Figura 8: Alcaloides isolados de <i>Aspidosperma</i> spp. ....                                     | 31 |
| Figura 9: Alcalóides indólicos isolados de <i>A. excelsum</i> .....                                | 36 |

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

|   |    |
|---|----|
| Quadro 1: Uso de <i>B. excelsa</i> para fins medicinais. ....   | 26 |
| Quadro 2: Atividade antiplasmódica de <i>B. excelsa</i> . ....  | 28 |
| Tabela 1: Massa dos extratos secos de <i>B. excelsa</i> e seus respectivos rendimentos a partir do material vegetal utilizado.....    | 41 |
| Tabela 2: Triagem de extratos de <i>B. excelsa</i> frente à estirpe K1 de <i>Plasmodium falciparum</i> . ....                         | 43 |
| Tabela 3: Concentração inibitória (CI <sub>50</sub> ) de extratos de <i>B. excelsa</i> frente à cepa K1 de <i>P. falciparum</i> ..... | 45 |
| Tabela 4: Atividade antimalárica e citotóxica do extrato e frações de <i>A. excelsum</i> .....  | 47 |
| Tabela 5: Atividade antimalárica e citotóxica de alcaloides isolados de <i>A. excelsum</i> .....                                      | 48 |

## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| INTRODUÇÃO.....  | 14 |
| 1. REVISÃO DA LITERATURA.....                                | 16 |
| 1.1. MALÁRIA.....  | 16 |
| 1.1.1. Ciclo biológico do parasita.....                      | 16 |
| 1.1.2. Epidemiologia.....                                    | 19 |
| 1.1.3. Antimaláricos .....                                   | 20 |
| 1.1.4. Resistência aos antimaláricos .....                   | 21 |
| 1.1.5. Plantas como fontes de novos antimaláricos .....      | 23 |
| 1.2. <i>Bertholletia excelsa</i> BONPL. ....                 | 24 |
| 1.2.1. Uso tradicional.....                                  | 25 |
| 1.2.2. Atividade biológica .....                             | 26 |
| 1.2.3. Composição química .....                              | 28 |
| 1.3. <i>Aspidosperma excelsum</i> BENTH.....                 | 30 |
| 1.3.1. Uso tradicional.....                                  | 30 |
| 1.3.2. Composição Química e Atividade biológica.....         | 31 |
| 2. OBJETIVOS.....  | 32 |
| 2.1. GERAL .....   | 32 |
| 2.2. ESPECÍFICOS.....  | 32 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS .....                                  | 33 |
| 3.1. COLETA E PROCESSAMENTO DO MATERIAL VEGETAL.....         | 33 |
| 3.1.1. Castanha do Brasil ( <i>B. excelsa</i> ).....         | 33 |
| 3.1.2. Carapanaúba ( <i>A. excelsum</i> ) .....              | 34 |
| 3.2. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS, FRAÇÕES E SUBSTÂNCIAS PURAS. ... | 34 |
| 3.2.1. Castanha do Brasil ( <i>B. excelsa</i> ).....         | 34 |
| 3.2.2. Carapanaúba ( <i>A. excelsum</i> ) .....              | 35 |

|        |   |    |
|--------|---|----|
| 3.3.   | CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE <i>Plasmodium falciparum</i> ..... | 36 |
| 3.3.1. | Microteste de suscetibilidade <i>in vitro</i> .....           | 37 |
| 3.4.   | CITOTOXICIDADE <i>IN VITRO</i> .....                          | 38 |
| 4.     | RESULTADOS E DISCUSSÃO .....                                  | 40 |
| 4.1.   | <i>Bertholletia excelsa</i> .....                             | 40 |
| 4.1.1. | Rendimento das extrações .....                                | 40 |
| 4.1.2. | Atividade antimalárica <i>in vitro</i> .....                  | 42 |
| 4.2.   | <i>Aspidosperma excelsum</i> .....                            | 46 |
|        | CONCLUSÃO.....  | 51 |
|        | REFERÊNCIAS .....   | 52 |

## INTRODUÇÃO

A malária é uma doença infecciosa causada por protozoários do gênero *Plasmodium* que acomete milhões de pessoas no mundo. Mesmo após um período de redução nas taxas de morbidade e mortalidade, em 2017 foram estimados mais de 200 milhões de casos e 400 mil óbitos causados pela doença em todo o planeta (WHO, 2018).

Duas das principais classes de antimaláricos disponíveis foram desenvolvidas a partir de produtos naturais, quinina e artemisinina, que deram origem a análogos sintéticos e derivados semissintéticos utilizados em terapias combinadas que atualmente estão entre as principais medidas profiláticas e de tratamento da doença. No entanto, a disseminação de cepas do parasita resistentes a esses medicamentos, inclusive à terapia mais eficaz, tem ameaçado as medidas de controle e eliminação da doença (WHO, 2017).

A partir do surgimento de cepas de *Plasmodium* resistentes às drogas disponíveis, e sabendo que estes medicamentos foram desenvolvidos a partir de moléculas isoladas de plantas, estas representam uma fonte importante para a descoberta e desenvolvimento de novos antipalúdicos. A Amazônia, área endêmica da doença, apresenta uma diversidade de plantas utilizadas por comunidades tradicionais no tratamento da malária, que necessitam de estudos mais aprofundados sobre a sua composição química e potencial biológico (BRANDÃO et al., 1992; BRANDÃO et al., 2008; POHLIT et al., 2013). Entre as etnoespécies regionais de uso conhecido estão a castanheira (*Bertholletia excelsa*) e as carapanaúbas (*Aspidosperma* spp.) (OLIVEIRA et al., 2015).

A castanheira é uma espécie de grande importância socioeconômica para a Amazônia, fonte de bioprodutos de importância econômica internacional, como as amêndoas conhecidas mundialmente por seu alto valor nutritivo, ricas em lipídeos, proteínas, fibras e sais minerais (YANG, 2009). Entre as comunidades tradicionais é conhecido seu uso no tratamento de moléstias do fígado, hepatite e malária. Essas comunidades utilizam a casca, a entrecasca, e as amêndoas desta espécie na preparação de chás para o tratamento de malária e outras doenças (BRANDÃO et al., 1992; COELHO-FERREIRA, 2009; TOMCHINSKY, 2014; FRAUSIN et al., 2015).

As carapanaúbas são plantas de uso difundido na medicina tradicional, onde a madeira e as cascas são utilizadas no tratamento de moléstias no fígado e no estômago, diabetes, inflamações no útero e no ovário, contra câncer, como contraceptivo e contra a malária

(ÃNEZ, 2009). A composição química destas plantas é bastante conhecida, são ricas em alcaloides, muitos destes com atividade antiplasmódica já descritas, como aspidoscarpina, elipticina e olivacina (ANDRADE-NETO et al., 2007; ROCHA E SILVA, 2014).

O conhecimento tradicional sobre estas e outras plantas é a esperança para a descoberta de novas substâncias capazes de atuar no combate à malária e a outras doenças. Em uma contribuição ao conhecimento sobre a composição química e o potencial biológico destas espécies, e à busca por novas alternativas terapêuticas a partir de fontes naturais, este trabalho é uma investigação da atividade antiplasmódica *in vitro* de extratos de *Bertholletia excelsa*, frações e substâncias isoladas de *Aspidosperma excelsum*.

## 1. REVISÃO DA LITERATURA

### 1.1. MALÁRIA

A malária é uma doença infecciosa que acomete milhões de pessoas nas zonas tropicais e subtropicais do planeta. Seu quadro clínico caracteriza-se por febre alta, acompanhada de calafrios, sudorese e cefaleia, podendo evoluir para formas mais graves, causando anemia intensa, icterícia, hemorragias, alteração de consciência, coma e óbito (BRASIL, 2015). Após um declínio nas taxas de morbidade e mortalidade nos últimos anos, o recente aumento no número de casos é um desafio para o progresso no controle da doença (WHO, 2018).

Seus agentes etiológicos são protozoários alveolados (Alveolata) pertencentes ao Filo Apicomplexa, Família Plasmodiidae e gênero *Plasmodium*. Atualmente, as espécies capazes de infectar o ser humano são: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale*, *P. knowlesi*, com relato recente no Brasil de malária humana causada por *P. simium* (BRAGA e FONTES, 2010; WHO, 2016; PATRÍCIA-BRASIL et al., 2017).

Destas espécies, a mais predominante na região das Américas é o *P. vivax*. O *P. falciparum* causa maior morbidade e mortalidade, é mais prevalente na região Africana e apresenta-se hoje como um grave problema terapêutico em razão da crescente resistência as drogas disponíveis. No Brasil, as espécies responsáveis pelos casos notificados são *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae*, sendo a *P. vivax* responsável por 89 % dos casos e *P. falciparum* por 11% (WHO, 2018).

A transmissão ocorre através da picada de fêmeas de mosquitos do gênero *Anopheles* durante o repasto sanguíneo (BRAGA e FONTES, 2010). Pertencente à ordem Diptera e a família Culicidae, o gênero compreende cerca de 400 espécies, das quais 33 ocorrem na Amazônia onde *An. darlingi* é o principal vetor (TADEI e THATCHER, 2000). Na África, *An gambiae* é o vetor principal e difere do vetor brasileiro por sua alta voracidade e antropofilia (FRATUS, 2008).

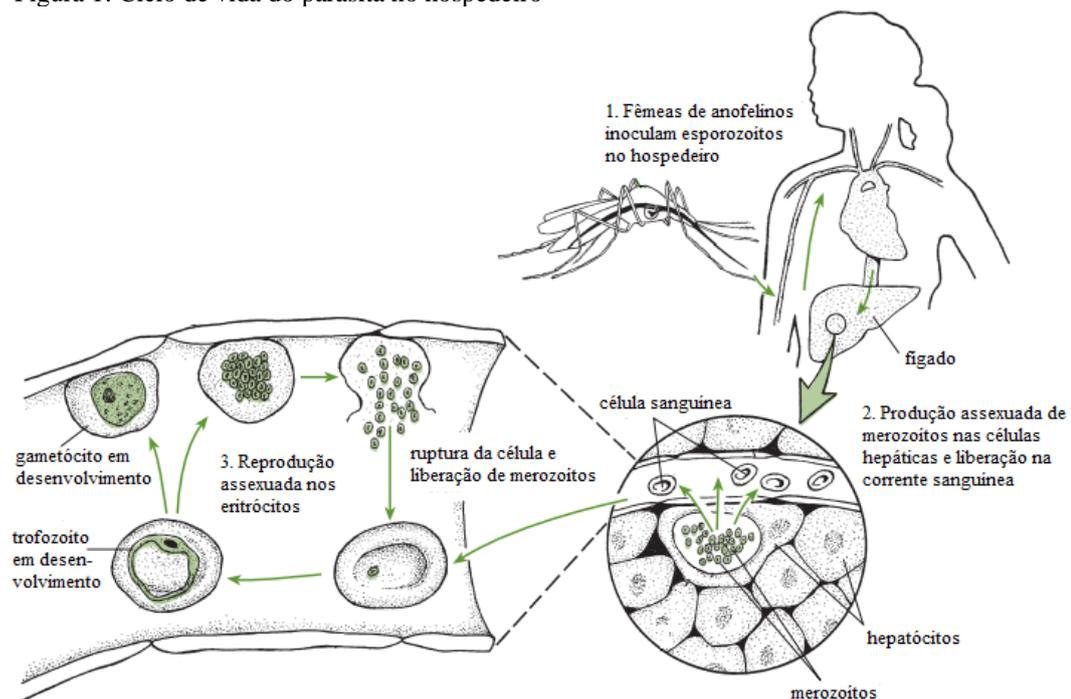
#### 1.1.1. Ciclo biológico do parasita

O parasita apresenta um ciclo de vida complexo dividido em duas etapas, uma fase assexuada que ocorre no hospedeiro vertebrado, e a fase sexuada que ocorre no inseto vetor.

A infecção acontece quando fêmeas de anofelinos inoculam formas infectantes do protozoário no hospedeiro, os esporozoítos. Móveis, os esporozoítos entram na corrente sanguínea até alcançarem os hepatócitos, célula hospedeira onde se processa o desenvolvimento parasitário (BRAGA e FONTES, 2010).

No hepatócito ocorre a primeira fase do ciclo assexuado, a fase pré-eritrocítica. Nesta etapa, após invadirem os hepatócitos, os esporozoítos se diferenciam em trofozoítos, que então se multiplicam por reprodução assexuada do tipo esquizogonia, originando os esquizontes multinucleados, que rompem a célula e liberam os merozoítos. Nas infecções por *P. vivax* e *P. ovale* populações do parasita permanecem em estado de latência no hepatócito, os hipnozoítos (do grego *hipnos*, sono), sendo responsáveis pelas recaídas da doença que ocorrem após meses ou anos de incubação (BRAGA e FONTES, 2010; PECHENIK, 2016). A figura 1 apresenta de forma resumida a primeira fase do ciclo do parasita no hospedeiro.

Figura 1: Ciclo de vida do parasita no hospedeiro



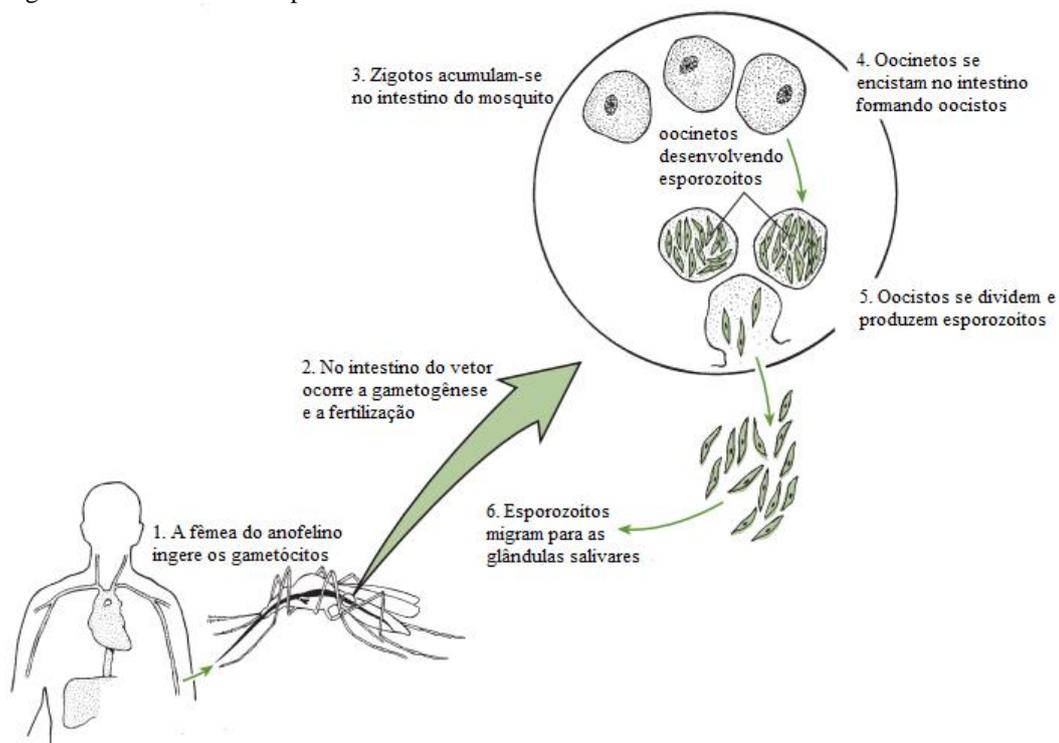
Fonte: adaptada de Pechenik (2016).

A fase eritrocítica, no sangue, inicia quando os merozoítos deixam os hepatócitos e invadem os eritrócitos. Após a penetração, os merozoítos transformam-se em trofozoítos e se desenvolvem por esquizogonia, formando esquizontes com novos merozoítos. Os eritrócitos se rompem liberando milhares de merozoítos que invadem novos eritrócitos. Depois de algumas gerações de merozoítos ocorre a diferenciação em estágios sexuais, os gametócitos,

que permanecem na membrana dos eritrócitos até serem ingeridos pelos mosquitos dando início ao ciclo sexuado (BRAGA e FONTES, 2010; PECHENIK, 2016).

O ciclo sexuado do parasita ocorre no vetor, a fêmea do anofelino ingere os gametócitos, em seu intestino ocorre a gametogênese e estes se transformam em gametas. O gametócito masculino passa por um processo denominado exflagelação e dá origem aos microgametas, móveis, que irão fecundar os macrogametas femininos. A fertilização do macrogameta dará origem ao zigoto, que posteriormente adquire motilidade e é denominado oocineto. No intestino médio, o oocineto se encista no epitélio do órgão e passa a ser chamado oocisto. Este cresce, passa por sucessivas divisões esporogônicas e após a ruptura da parede do oocisto libera os esporozoítos. Através da hemolinfa estes migram até as glândulas salivares, de onde podem ser injetados no hospedeiro vertebrado juntamente com a saliva (BRAGA e FONTES, 2010; PECHENIK, 2016). A figura 2 mostra de forma resumida o ciclo do parasita no vetor.

Figura 2: Ciclo de vida do parasita no vetor



Fonte: adaptada de Pechenik (2016).

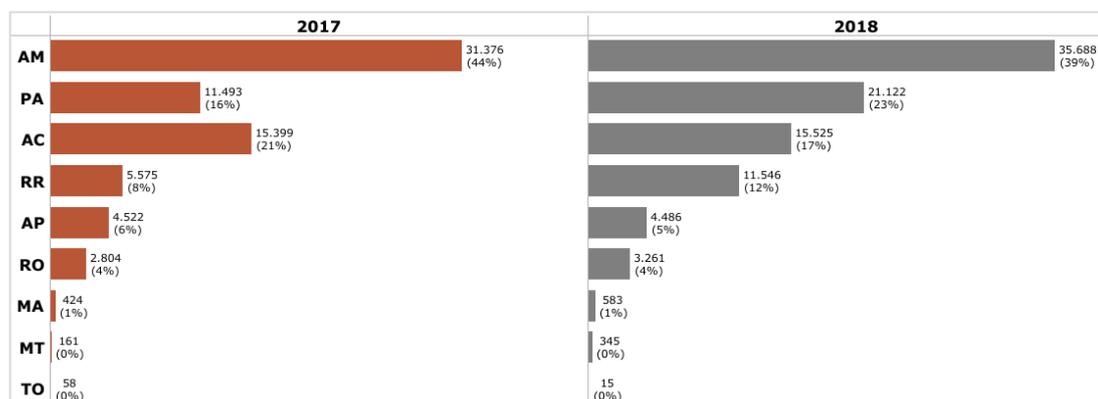
### 1.1.2. Epidemiologia

A malária é uma das principais doenças parasitárias do mundo, amplamente distribuída nas regiões tropicais e subtropicais do planeta. Em 2017 foram estimados cerca de 219 milhões de casos, com quase metade da população mundial sob risco de infecção. Quanto aos índices de mortalidade, foram reportados cerca de 435 mil óbitos, 93 % ocorridos na região africana, onde crianças menores de cinco anos são as principais vítimas (WHO, 2018).

A maioria dos casos notificados em 2017 ocorreu na região africana (92%), onde o *P. falciparum* é o parasita mais prevalente e foi responsável por 99,7% dos casos estimados. Nas Américas o parasita predominante é o *P. vivax*, responsável por 74,1% dos casos notificados na região e por 3,4% da incidência mundial. Estima-se que a taxa de incidência mundial tenha reduzido em 18%, de 72 para 59 casos por mil habitantes em risco entre 2010 (237 mi) e 2017. Entretanto, nos dois últimos anos ocorreram aumentos na ocorrência de casos nas regiões endêmicas, onde a região das Américas registrou aumento significativo devido ao aumento de casos na Venezuela e no Brasil (WHO, 2018).

Atualmente o quadro da doença no Brasil tem despertado preocupação em relação ao aumento na taxa de incidência. Após um progresso no controle da malária, o Brasil registrou um salto significativo nos casos nos últimos anos, de 124 mil em 2016 para mais de 190 mil em 2017. Destes, 99,9% foram transmitidos na região amazônica, onde o *P. vivax* é a espécie causadora da maioria dos casos (WHO, 2018; BRASIL, 2018). Em 2018 a incidência da doença continuou aumentando e no primeiro semestre foram registrados mais de 90 mil casos da doença apenas na região amazônica, um aumento de 29% em relação ao mesmo período do ano anterior (Fig. 3) (BRASIL, 2018).

Figura 3: Casos de malária notificados na região amazônica de janeiro a junho de 2017 e 2018.



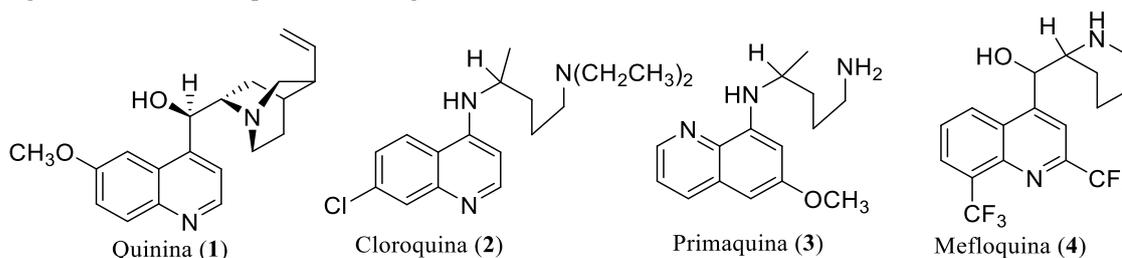
Fonte: Brasil (2018).

### 1.1.3. Antimaláricos

Os antimaláricos continuam sendo a base do tratamento e controle da doença. Descobertos a partir de plantas medicinais, deram origem a terapias combinadas que são hoje a primeira linha de tratamento da malária (WHO, 2017).

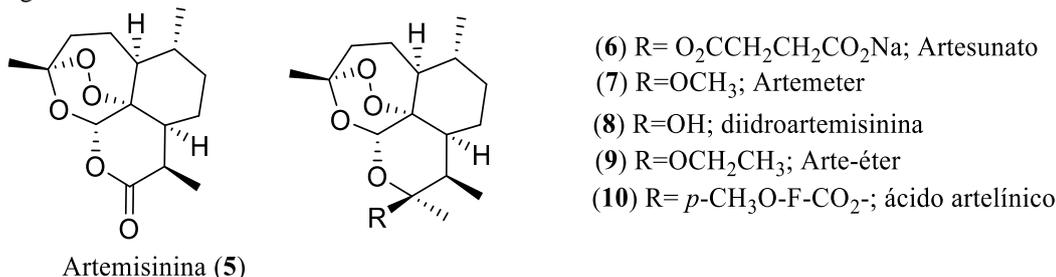
A primeira substância utilizada no tratamento da malária foi obtida de cascas de quina-quina (*Cinchona* spp.), uma planta utilizada por indígenas no tratamento de febres desde o século XVI. A “casca dos jesuítas”, como foi referida por seu uso por missionários jesuítas na América do Sul, levou à descoberta do quinina (1), um alcaloide isolado de uma *Cinchona* sp. em 1820. A descoberta do quinina possibilitou a síntese de outros antipalúdicos 2-4, os análogos quinolínicos e as aminoquinolinas sintéticas (Fig 4) (VALE et al., 2005; CUNICO et al., 2008; ACHAN et al., 2011).

Figura 4: Estrutura do quinina e análogos sintéticos



Em 1972 químicos chineses isolaram a artemisinina (5), outro importante antimalárico, a partir do *qinghao* (*Artemisia annua*), uma erva utilizada por muitos séculos na medicinal tradicional chinesa para tratar febre e malária. A partir da artemisinina outras substâncias foram sintetizadas 6-10 (Fig 5), tais como o arteméter (7) e diidroartemisinina (8). O tratamento com estas drogas produz altas taxas de recrudescência e a monoterapia é desaconselhada devido ao seu efeito rápido, sendo necessária sua combinação com outros antimaláricos, como análogos quinolínicos, para potencializar sua ação (WHO 2010).

Figura 5: Estrutura da artemisinina e seus derivados



As terapias combinadas baseadas em artemisinina (TCAs, ACTs em inglês) combinam um derivado de artemisinina com uma droga parceira, onde o artemisinínico reduz o número de parasitas durante os três primeiros dias de tratamento, enquanto o medicamento parceiro elimina os parasitas remanescentes (WHO, 2018). Atualmente essas drogas são o tratamento de primeira linha para malária não complicada causada por *P. falciparum*, e têm sido importantes no controle global da doença. No entanto, nos últimos anos o progresso no controle da malária tem sido ameaçado pelo desenvolvimento e propagação de resistência dos parasitas aos antimaláricos, inclusive a esta terapia.

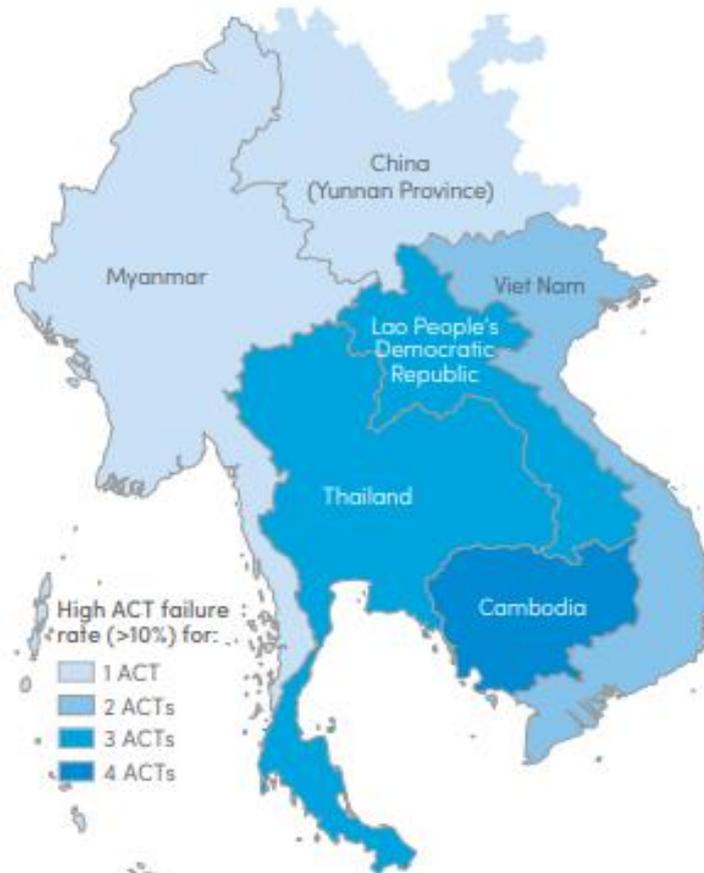
#### **1.1.4. Resistência aos antimaláricos**

Ao longo dos anos os parasitas vêm desenvolvendo resistência a uma série de antipalúdicos, um grande desafio para o controle da malária em todo o mundo. A Organização Mundial da Saúde (OMS) classifica a resistência antimalárica como a capacidade do parasita de sobreviver e se multiplicar, apesar da administração e absorção de um medicamento em doses iguais ou superiores às normalmente recomendadas (WHO, 2018). Essa resistência já foi relatada em *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. malariae*, e tem como base eventos genéticos que ocorrem independentemente do fármaco. O problema é agravado pela resistência cruzada, onde a resistência a uma droga confere resistência a outros medicamentos que pertencem a uma mesma família química ou que tenham mecanismos de ação semelhantes (WHO, 2015).

A diminuição da sensibilidade a quinina foi relatada pela primeira vez no Brasil em 1910, um século após sua introdução. Em 1961 foram descritos os primeiros casos de resistência à cloroquina (SILVA, 1961; ACHAN et al., 2011). Vinte anos depois, Alecrim (1981) também relatou a resistência de *P. falciparum* à cloroquina em estudos *in vitro*. Estudos *in vitro* com *P. vivax* também têm confirmado a diminuição da sensibilidade deste parasita à cloroquina na região amazônica, onde este último é o responsável pela maioria dos casos de malária (CHEHUAN et al., 2013; MARQUES et al., 2013).

Os casos de resistência de *P. falciparum* a todas as classes de antimaláricos é um fato preocupante. Até pouco tempo, as terapias à base de artemisinina apresentavam alta eficácia no combate a cepas multirresistentes do parasita, entretanto, nos últimos anos, casos de resistência a estas drogas têm sido registrados em países da Sub-região do Grande Mekong: Camboja, Mianmar, Tailândia, Vietnã e República Popular Democrática do Laos (Fig. 6) (WHO, 2018).

Figura 6: Países que notificaram resistência de *P. falciparum* às TCAs



Fonte: WHO (2018).

A resistência à artemisinina refere-se a um atraso na eliminação dos parasitas da corrente sanguínea após o tratamento com uma TCA, onde o derivado de artemisinina é menos eficaz na eliminação dos parasitas em pacientes infectados por cepas resistentes. Mesmo com os esforços para conter a propagação de cepas resistentes, estudos moleculares mais recentes mostraram que a resistência à artemisinina emergiu de forma independente nos países relatados, assim como na Guiana, devido a mutações no gene que codifica a proteína *kelch* 13 (K13), um marcador molecular de resistência à artemisinina e derivados. Além disso, a resistência surgiu também às drogas parceiras das TCAs, ameaçando o progresso no controle da doença alcançado na região até o momento (WHO, 2018).

A OMS classifica a resistência às TCAs como parcial e ressalta que, no momento, estas permanecem como tratamento de primeira para a malária não complicada causada por *P. falciparum* e *P. vivax*, atuando de modo eficaz desde que a droga parceira continue atuando de maneira eficiente (WHO, 2018).

A propagação de cepas resistentes a estes medicamentos pode trazer graves consequências à saúde pública, uma vez que ainda não esteja disponível nenhuma alternativa

terapêutica com a mesma eficácia. Com isso, as buscas por novas drogas capazes de atuar no tratamento e controle da doença se intensificam, e as plantas são fontes importantes nessa investigação.

### 1.1.5. Plantas como fontes de novos antimaláricos

As plantas têm sido utilizadas na medicina tradicional desde a antiguidade. Esse conhecimento vem contribuindo para a descoberta e desenvolvimentos de diversos fármacos obtidos a partir de princípios ativos isolados destas espécies (BRANDÃO et al., 2008).

Os antimaláricos conhecidos foram desenvolvidos a partir de produtos naturais obtidos de plantas medicinais utilizadas durante séculos no tratamento da malária. Com o surgimento de cepas de *Plasmodium* resistentes a essas drogas, as plantas de uso tradicional representam uma fonte promissora para a descoberta e desenvolvimento de novos antipalúdicos. Neste contexto, o grupo de pesquisa do Laboratório de Princípios Ativos da Amazônia (LAPAAM), do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), tem conduzido estudos sobre a composição química e a atividade antiplasmódica de substâncias isoladas de plantas amazônicas (ANDRADE-NETO et al., 2007; POHLIT et al., 2009; PINTO et al., 2010).

O 4-nerolidilcatecol (4-NC), isolado de raízes *Pothomorphe peltata*, foi submetido à avaliação antimalárica *in vitro* e apresentou atividade significativa contra a cepa K1 de *P. falciparum*, com  $CI_{50}$  igual a 0,69  $\mu$ M (ANDRADE-NETO et al., 2007). Em estudos posteriores, o 4-NC isolado de *Piper peltatum* também apresentou capacidade inibitória importante contra isolados de campo de *P. falciparum*, com  $CI_{50}$  de  $M1=0,05 \mu$ g/mL e  $M2=0,83 \mu$ g/mL (ROCHA E SILVA et al., 2011); neste estudo também se avaliou o percentual de inibição *in vivo* contra *P. berghei*, onde foi relatado maior supressão nos dias 5 e 7 (63,1 e 59,7%) por doses orais de 600 mg/Kg/dia e 61,3% no dia 7 por doses subcutâneas. Os derivados semissintéticos de 4-NC (1,2-*O,O*-diacetil-4-nerolidilcatecol, 2-*O*-benzil-4-nerolidilcatecol e 1,2-*O,O*-dibenzoil-4-nerolidilcatecol) apresentaram menor atividade *in vitro* que o produto natural ( $CI_{50}>4,0 \mu$ M); já na avaliação *in vivo*, o 1,2-*O,O*-diacetil-4-nerolidilcatecol apresentou supressão da parasitemia maior que 4-NC na dose mais elevada (600 mg/kg/dia) nas vias oral e subcutânea (72% e 64%) no quinto dia após o início do tratamento (ROCHA E SILVA et al., 2015).

Os quassinoides neosergeolida e isobruceina B, isolados das raízes e caule de *Picrolemma sprucei*, apresentaram atividade antiplasmódica *in vitro* bastante promissora contra a estirpe K1 de *P. falciparum*, com  $CI_{50}$  de 0,008 e 0,002  $\mu$ M (ROCHA E SILVA et al., 2009). Neste estudo também avaliaram a atividade antiplasmódica *in vitro* de dois derivados

semissintéticos desses quassinoides, o 1,12-diacetilisobruceína B e o 12-acetilneosergeolida, onde o segundo apresentou  $CI_{50}$  igual a 0,216  $\mu M$ .

Andrade-Neto et al. (2007) avaliaram a atividade *in vitro* dos alcaloides indólicos elipiticina e aspidoscarpina, isolados das cascas de *A. williamii* (identificada incorretamente como *A. vargasii*) e *A. desmanthum*, respectivamente, que apresentaram capacidade inibitória promissora ( $CI_{50}$  0,073 e 0,019  $\mu M$ ) contra a cepa K1 de *P. falciparum*. Em estudo posterior, Rocha e Silva et al. (2012) relataram a supressão de 100% da parasitemia em camundongos tratados com elipiticina (50 mg/kg/dia) via oral, no 5° e 7° dia após a infecção por *P. berghei*. Neste estudo a atividade *in vitro* contra as estirpes K1 e 3D7 de *P. falciparum* apresentaram  $CI_{50}$  igual a 0,81 e 0,35  $\mu M$ , respectivamente. Em trabalho recente do LAPAAM o derivado sintético 9-nitroelipiticina apresentou atividade antiplasmodica *in vitro* contra a cepa K1 de *P. falciparum* ( $CI_{50}$  0,55  $\mu M$ ) maior que a elipiticina ( $CI_{50}$  0,81  $\mu M$ ) (MONTAIA et al., 2014).

Com base nestes estudos e diante da necessidade em descobrir e desenvolver novos antimaláricos, o presente trabalho é uma investigação da atividade antiplasmódica de *B. excelsa* e *A. excelsum*, espécies nativas amplamente utilizadas no combate à malária na medicina tradicional.

## 1.2. *Bertholletia excelsa* BONPL.

*Bertholletia excelsa* é uma árvore de grande porte, com copa grande e emergente, que alcança até 60 metros de altura. É encontrada em florestas não inundáveis da Amazônia, em grupamentos de 50 a 100 indivíduos conhecidos como castanhais (MORI & PRANCE, 1990). No Brasil ocorre nos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Mato Grosso, Pará, Rondônia e Roraima (SMITH et al., 2015).

Originalmente foi descrita em 1807 por Humboldt, Bonpland e Kunth, de uma coleção vinda da Venezuela após uma viagem de estudos pela América do Sul entre 1799 e 1804. O gênero foi nomeado em homenagem ao químico francês Claude Louis Berthollet (1748-1822), e o epíteto específico em alusão à altura e exuberância da espécie. Assim, a “árvore majestosa” foi então denominada *Bertholletia excelsa* Bonpl. (MORI & PRANCE, 1990; PACHECO & SCUSSEL, 2006).

De acordo com a classificação sistemática, a *B. excelsa* pertence à divisão Magnoliophyta, classe Magnoliopsidae, ordem Ericales e família Lecythidaceae. Conhecida popularmente como castanheira, castanha-do-Pará, castanha-da-Amazônia, noz amazônica,

noz boliviana, tocari, entre outros nomes. Em setembro de 1961 o Ministério da Agricultura regulamentou a denominação de castanha-do-Brasil, para efeito de comércio exterior, por meio do decreto 51.209 de 18/09/1961 (BRASIL, 1961).

A Família Lecythidaceae abriga cerca de 300 espécies distribuídas em 25 gêneros, dos quais 150 espécies e 10 gêneros ocorrem no Brasil (NASCIMENTO et al., 2010). A castanha-do-Brasil representa a única espécie existente no gênero *Bertholletia*, embora Miers descreva, em 1874, outra espécie coletada no Estado do Amazonas, denominada de *Bertholletia nobilis* Miers. No entanto Mori e Prance (1990) argumentam que tal classificação baseia-se em características que não são válidas para diferenciar espécies de Lecythidaceae, considerando então *B. nobilis* sinonímia de *B. excelsa*.

As árvores possuem tronco reto, cilíndrico e desprovido de ramos. Os galhos são encurvados nas extremidades, com folhas alternadas em formato oval e alongadas. As inflorescências estão dispostas nos ramos terminais da planta, com flores suavemente perfumadas e coloração branca amarelada. Os frutos possuem formato de cápsula, do tipo pixídio incompleto, contendo entre 12 e 25 sementes em formato triangular anguloso, com superfície muito rígida e rugosa (MORI & PRANCE, 1990; TONINI & ARCO-VERDE, 2004).

A castanha-do-Brasil é um dos produtos mais valiosos da Amazônia. Suas amêndoas apresentam alto valor nutritivo como fontes de lipídios, proteínas e minerais (YANG, 2009). A exploração destas sementes garante o sustento de inúmeras comunidades extrativistas, agregando à espécie valor econômico e social.

### **1.2.1. Uso tradicional**

Além do consumo das sementes na alimentação, as comunidades amazônicas relatam o uso de outras partes morfológicas da planta na medicina popular. Em seu estudo sobre o uso de plantas medicinais em uma comunidade do Estado do Pará, Coelho-Ferreira (2009) relatou a utilização da entrecasca e de sementes de *B. excelsa* no tratamento de doenças como gripe, anemia, hepatite, malária etc. O uso da casca no tratamento de moléstias do fígado e como antimalárico também é relatado em outros estudos recentes, conforme o quadro 1.

Quadro 1: Uso de *B. excelsa* para fins medicinais.

| <b>Origem</b>   | <b>Partes utilizadas</b>     | <b>Indicação</b>  | <b>Fonte</b>           |
|---|------------------------------|---|------------------------|
| <b>Comunidade Maruda, PA.</b>                                 | Entrecasca e sementes        | Malária, hepatite, anemia, hemorragia pós-parto, gripe e congestão. | COELHO-FERREIRA, 2009. |
| <b>Barcelos, AM.</b>  | Semente, casca e entrecasca. | Malária, hepatite, fígado e infecção.                               | TOMCHINSKY, 2014.      |
| <b>Santa Isabel do Rio Negro, AM.</b>                         | Casca e sementes             | Malária, limpeza do sangue e inchaço do fígado.                     | FRAUSIN et al., 2015.  |
| <b>Comunidades remanescentes de quilombos, Oriximiná, PA.</b> | Casca interna da semente     | Malária e icterícia.  | OLIVEIRA et al., 2015. |

Em levantamentos de plantas medicinais utilizados no tratamento de malária, Frausin et al. (2015) relataram cinquenta e cinco espécies de plantas utilizadas na região do alto rio Negro. Neste estudo relataram novamente o uso da casca e da semente de *B. excelsa* como antimaláricos, utilização citada anteriormente por Brandão et al. (1992) e Hidalgo (2003). Oliveira et al. (2015) também relataram o uso de cascas e sementes de castanha-do-Brasil no tratamento da malária em comunidades quilombolas do Pará. A terapia é realizada principalmente através de infusão e decocção do material vegetal utilizado, em outras situações são preparados macerados que são ingeridos como “água” durante o tratamento (COELHO-FERREIRA, 2009; FRAUSIN et al., 2015; TOMCHINSKY, 2014).

### 1.2.2. Atividade biológica

A partir dos relatos do uso da planta na medicina popular, diversos estudos foram desenvolvidos a fim de comprovar as atividades biológicas de *B. excelsa*, em especial, atividades antiparasitárias.

Em um estudo sobre a atividade tripanocida da casca de *B. excelsa*, Campos et al. (2005) encontraram inibição significativa sobre as formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*. Foram avaliados extratos, frações e uma substância, onde o extrato em acetona (100%),

as frações etanólica (88%) e butanólica (79%) e o ácido betulínico (75%) apresentaram resultados promissores a uma concentração de 500 µg/mL.

Sousa (2013) relatou atividade antiplasmódica *in vitro* da casca e ouriço de *B. excelsa* frente à cepa 3D7 de *Plasmodium falciparum*. O extrato EtOH da casca apresentou CI<sub>50</sub> de 6,0 µg/mL, a fração AcOEt 0,1 µg/mL e a fração acetona 15 µg/mL. A fração acetona do ouriço apresentou CI<sub>50</sub> de 10 µg/mL. No mesmo estudo foram realizados ensaios *in vivo* do extrato EtOH e da fração AcOEt da casca em camundongos infectados com a cepa NK65 de *Plasmodium berghei*. As amostras apresentaram inibição da parasitemia igual a 99,3 e 88,0%, respectivamente.

Em uma investigação sobre o efeito protetor de *B. excelsa* sobre camundongos infectados por *P. berghei*, Martins (2013) acompanhou dois grupos de animais infectados. O primeiro recebeu a solução aquosa contendo a amêndoa triturada e liofilizada em uma dose de 0,04 g/kg via oral por 11 dias antes da infecção. O outro grupo não recebeu o pré-tratamento. No décimo dia de infecção foi detectada uma redução de 37,5% da parasitemia no grupo que recebeu a solução em relação ao grupo sem pré-tratamento.

Oliveira et al. (2015) relataram atividade antimalárica *in vitro* frente a estirpe W2 de *P. falciparum*, com resultados significativos de extratos de castanha-do-Brasil. Neste estudo foram avaliados extratos etanólicos da casca, da “casca do ouriço”, do caule e a seiva, obtidos por maceração. O extrato da casca apresentou CI<sub>50</sub> igual a 2,0 µg/mL, o da casca do ouriço 4,7 µg/mL, e pela primeira vez foi relatada a atividade *in vitro* da seiva, coletada de amostras frescas da entrecasca da árvore umedecida em água. O quadro 2 mostra os estudos recentes sobre a atividade antiplasmódica de *B. excelsa*.

Quadro 2: Atividade antiplasmódica de *B. excelsa*.

| Partes utilizadas                      | Extratos e frações                                  | Atividade <i>in vitro</i> CI <sub>50</sub> (µg/mL) <i>P. falciparum</i> | Inibição da parasitemia (%) <i>in vivo</i> <i>P. berghei</i> | Fonte                  |
|--|---|---|--|------------------------|
| Amêndoa <i>in natura</i>               | Amêndoa liofilizada e diluída em água.              | -   | 37,5   | MARTINS, 2013.         |
| Cascas<br>Ouriço                       | Ex. EtOH<br>Fr. AcOEt<br>Fr. acetona<br>Fr. acetona | 6,0 ± 0,05<br>0,1 ± 0,05<br>15 ± 0,05<br>10 ± 0,05                      | 99,3<br>88,0<br>-<br>-                                       | SOUZA, 2013.           |
| Casca do ouriço<br>Casca<br>Entrecasca | EtOH<br>EtOH<br>Seiva                               | 4,7 ± 0,7<br>2,0 ± 0,0<br>7,5 ± 3,5                                     | -<br>-<br>-  | OLIVEIRA et al., 2015. |

### 1.2.3. Composição química

A castanha-do-Brasil apresenta alto valor nutricional, suas amêndoas são fontes de lipídios (60-70%), proteínas (17%), minerais (fósforo, cálcio, magnésio, zinco, potássio e cobre), vitaminas E e do complexo B, além de carboidratos, fibras e aminoácidos (YANG, 2009). O selênio (Se) é um dos elementos mais importantes desta espécie, que é a fonte natural mais conhecida deste nutriente. Esse mineral atua protegendo os sistemas biológicos contra doenças cardiovasculares, câncer de próstata, fígado, pulmões, tireoide, além de atuar como antioxidante (RAYMAN, 2012).

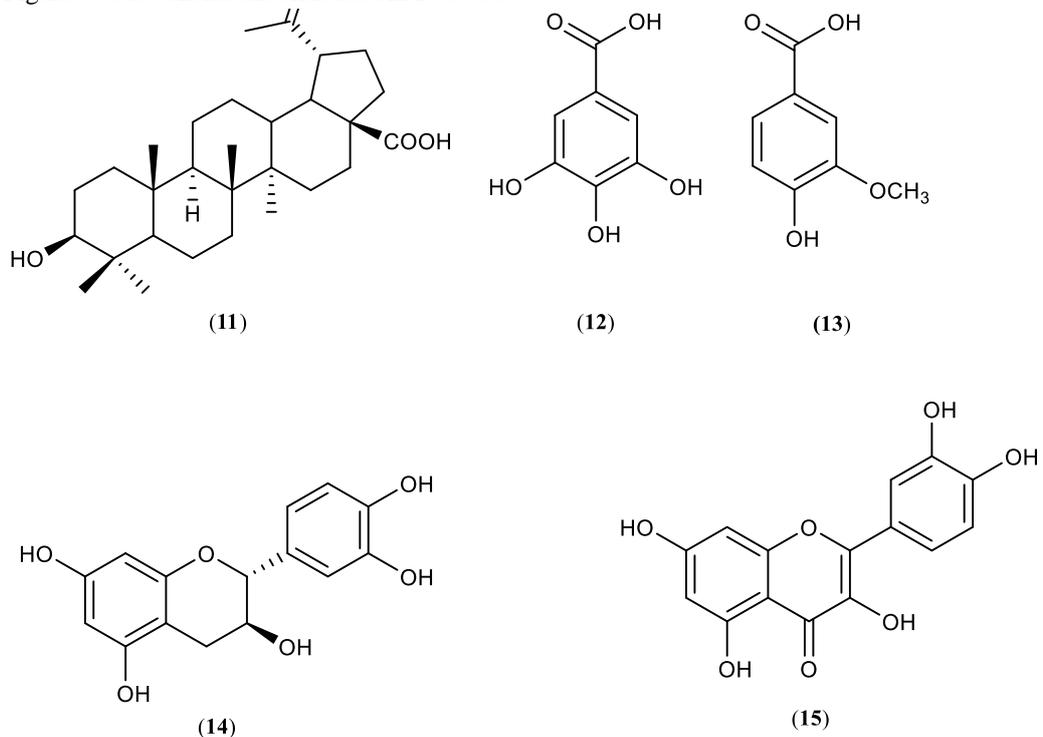
O óleo obtido das amêndoas é rico em ácidos graxos, como o palmítico (13,15%), oleico (37,42%), linoleico (37,75%), esteárico (10,36%) e araquidônico (1,32%), amplamente utilizado na alimentação e pela indústria de cosméticos (GONÇALVES et al., 2002; MELO, 2006).

Em estudo sobre a atividade tripanocida de *B. excelsa*, Campos et al. (2005) isolaram o ácido betulínico (**11**) do extrato hexânico da casca. Este triterpeno apresenta propriedades

biológicas conhecidas, como atividade anti-inflamatória, anticarcinogênica, antimicrobiana e antiplasmódica (MOGHADDAM et al., 2012).

Entre as substâncias fenólicas identificadas e quantificadas por John e Shahidi (2010) estão: o ácido gálico (**12**), ácido vanílico (**13**), catequina (**14**), quercetina (**15**) e ácido elágico (**16**) (Fig 7). Neste estudo foram identificadas substâncias fenólicas presentes na “pele marrom” da amêndoa, que apresentou maior teor de substâncias fenólicas e atividade antioxidante mais elevada que a amêndoa sem pele. O ácido elágico, encontrado em maior concentração na “pele marrom” da amêndoa, é um polifenol encontrado em diversas frutas e nozes, possui atividade anticarcinogênica, antioxidante e anti-inflamatória conhecida (LOARCA-PINÃ et al., 1998; STONER & MUKHTAR, 1995).

Figura 7: Substâncias encontradas em *B. excelsa*



Entre as inúmeras atividades biológicas do ácido elágico está a atividade antimalárica, onde esta substância e seus derivados se destacam como candidatos a novas drogas (FOTIE, 2010). Soh et al. (2008) mostraram o potencial antimalárico *in vitro* e *in vivo* do ácido elágico, que apresentou inibição significativa contra *P. falciparum*, com  $CI_{50}$  entre 105 e 330 nM frente as cepas testadas (F32, Dd2, FcB1, W2 e FcM29), além do seu efeito sinérgico com cloroquina, atovaquona, mefloquina e artesunato, potencializando a atividade destes antimaláricos. Nos estudos *in vivo* relataram inibição de 100% da parasitemia em

camundongos infectados por *P. vinckei petteri* tratados com doses de 50 e 100 mg/kg/dia de ácido elágico, além de avaliarem os efeitos profiláticos desta substância. Sturm et al. (2009) avaliaram derivados semissintéticos do ácido elágico, onde o ácido coruleo-elágico (CEA) apresentou atividade melhorada, com  $CI_{50}$  entre 42 e 116 nM frente as cepas 3D7, HB3, Dd2 e K1 de *P. falciparum*.

### 1.3. *Aspidosperma excelsum* BENTH.

*Aspidosperma excelsum* é uma árvore de grande porte encontrada em florestas de terra firme, denominada carapanaúba. No Brasil ocorre nos estados do Amazonas, Rondônia e Roraima (CASTELLO et al., 2018).

De acordo com a classificação botânica, *A. excelsum* pertence à divisão Magnoliophyta, classe Magnoliopsidae, subclasse Asteridae, ordem Gentiales, família Apocynaceae e gênero *Aspidosperma*. A família está entre as dez mais ricas em números de espécies, incluindo cerca de 400 gêneros e 3700 espécies encontradas predominantemente nos trópicos e subtropicais (RIBEIRO et al., 1999; CASTRO; LORENZI, 2008).

No Brasil, ocorrem cerca de 95 gêneros e 850 espécies de Apocynaceae (CASTRO; LORENZI, 2008). Na Reserva Florestal Adolfo Ducke foram encontrados 16 gêneros e 40 espécies da Família (RIBEIRO et al. 1999). O gênero *Aspidosperma* compreende espécies arbóreas de grande porte, com flores e sementes abundantes, que podem apresentar látex abundante, mas não apresentam látex no tronco circular como a maioria das espécies de Apocynaceae (RIBEIRO et al., 1999). Estas espécies possuem grande importância medicinal, são ricas fontes vegetais de constituintes químicos como glicosídeos e alcaloides, presentes nas sementes e látex, com grande utilidade na medicina moderna (CASTRO; LORENZI, 2008).

#### 1.3.1. Uso tradicional

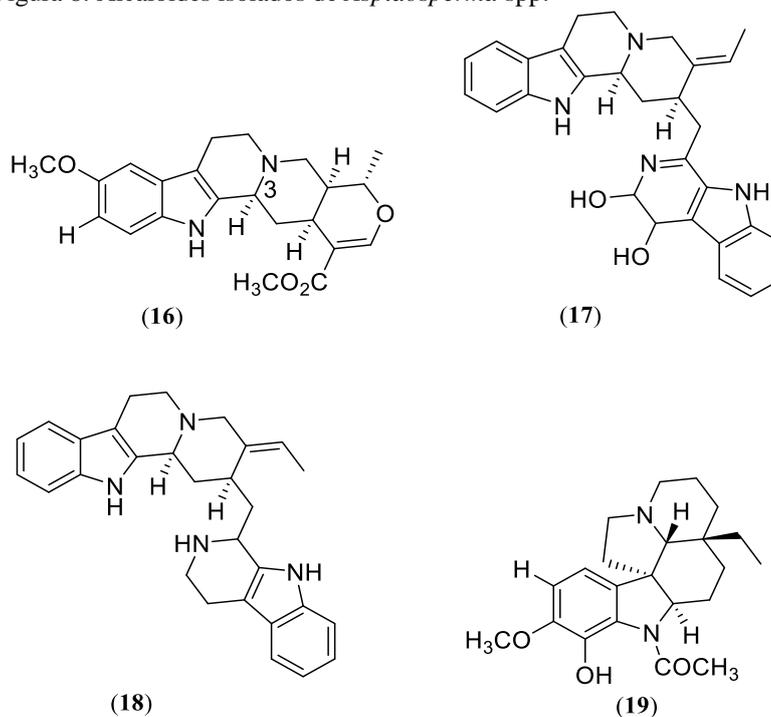
Várias espécies de *Aspidosperma* são utilizadas no tratamento da malária. As cascas e caules de *A. nitidum* são utilizadas no tratamento de infecções do fígado e do estômago (AÑEZ, 2009), como anti-inflamatório e anticoncepcivo (ARAÚJO et al., 2013) e no tratamento da malária (RUIZ et al., 2011; COUTINHO et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2015). Também é utilizada a *A. auriculatum* (típica da Região Amazônica), espécie conhecida no Pará como carapanaúba e indicada popularmente para tratar febre e outras afecções, inclusive à malária (BARBOSA et al., 2003). *A. desmanthum* apresentou atividade antiplasmódica

(ANDRADE-NETO et al., 2007; HENRIQUE et al., 2010). *A. excelsum* possui atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli* (Theodor Escherich), *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter), *Candida albicans* (Berkhout), *Aspergillus niger* (Van Tieghem), entre outros (VERPOORTE et al., 1982; VERPOORTE et al., 1983).

### 1.3.2. Composição química e atividade biológica

A atividade antiplasmódica de *Aspidosperma* spp. é bastante conhecida devido à grande indicação dessas espécies para o tratamento de malária na medicina tradicional. Rocha e Silva (2014) relatou atividade antimalárica *in vitro* significativa do extrato metanólico da casca de *A. marcgravianum*, com  $CI_{50}$  igual a 0,30  $\mu\text{g/mL}$  frente ao *P. falciparum*. Entre os alcaloides indólicos isolados de espécies do gênero (Fig. 8), o aricina (16) ( $CI_{50}$  0,46  $\mu\text{g/mL}$ ), o tchibangensina (17) ( $CI_{50}$  0,13  $\mu\text{g/mL}$ ) e tetraidrousambarensina (18) ( $CI_{50}$  0,26  $\mu\text{g/mL}$ ) apresentam capacidade inibitória promissora em estudos *in vitro* contra *P. falciparum* (PASSEMAR et al., 2011). A aspidoscarpina (19), alcaloide também relatado para esta espécie (PEREIRA et al., 2007), foi avaliado quanto a sua atividade antiplasmódica *in vitro* por Andrade-Neto et al. (2007) isolado de *A. desmanthum*, com  $CI_{50}$  igual a 0,019  $\mu\text{M}$  em estudo promissor. Estes alcaloides ainda não foram avaliados quanto ao seu potencial de inibição em modelos *in vivo*.

Figura 8: Alcaloides isolados de *Aspidosperma* spp.



## 2. OBJETIVOS

### 2.1. GERAL

- Avaliar a atividade antiplasmódica *in vitro* de extratos, frações e substâncias isoladas de *Bertholletia excelsa* Bonlp. e *Aspidosperma excelsum* Benth.

### 2.2. ESPECÍFICOS

- Preparar extratos ativos a partir de resíduos de *B. excelsa*;
- Avaliar a atividade antiplasmódica *in vitro* dos extratos, frações e substâncias puras frente a cepa K1 de *P. falciparum*;
- Avaliar a toxicidade das amostras em linhagens normais de fibroblastos humanos MRC-5.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi desenvolvido nas dependências do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) e da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), em colaboração com os projetos das teses de doutorado de Diana Maruja Sangama Mozombite (sobre *B. excelsa*) e Edizon Veiga Lopes (sobre *A. excelsum*), pelos Programas de Pós-Graduação em Biotecnologia e em Química (PPGBIOTEC e PPGQ/UFAM), respectivamente.

As propriedades biológicas e químicas das espécies estudadas vem sendo investigadas há longa data no LAPAAM/INPA e fazem parte de um grupo de etnoespécies utilizadas por comunidades quilombolas do município de Oriximiná - PA, reconhecidas como detentoras de Conhecimento Tradicional Associado (CTA) identificável sobre o uso de plantas medicinais no tratamento de malária (OLIVEIRA et al., 2015), com as quais o LAPAAM/INPA possui anuência assinada pelos representantes da Associação de Comunidades Remanescentes de Quilombos do Município de Oriximiná (ARQMO). Referentes às espécies acessadas neste estudo, existem os seguintes números de cadastro no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen): AAA58D3, A11C513 B e AEB51FC.

#### 3.1. COLETA E PROCESSAMENTO DO MATERIAL VEGETAL

##### 3.1.1. Castanha do Brasil (*B. excelsa*)

A coleta de *B. excelsa* foi realizada na Fazenda Aruanã, localizada no quilometro 215 da rodovia AM 010 (3°00'17S 58°49'48 W), município de Itacoatiara – AM, no dia 16 de novembro de 2016. A fazenda possui 12.000 hectares e mais de um milhão de castanheiras plantadas para a produção de frutos e extração da madeira, além da produção de mudas utilizadas em projetos de reflorestamento, sendo reconhecida como a maior plantação de castanheiras do mundo (MAUÉS et al., 2015; AGROPECUÁRIA ARUANÃ S.A, 2016).

Os materiais vegetais coletados são resíduos diversos que sobram do processamento dos frutos e dos produtos madeireiros da fazenda. Foram coletadas cascas do caule, cascas das amêndoas, folhas, galhos, raízes e ouriços. Para identificação foram coletadas partes férteis da planta para confecção de exsiccatas depositadas no Herbário da Coordenação de Biodiversidade (COBIO/INPA), sob o registro 277498.

No Laboratório de Princípios Ativos da Amazônia (LAPAAM/INPA), as amostras coletadas foram separadas e processadas para extração. As cascas do caule foram separadas em casca e entrecasca (envira), dos galhos foram retiradas as cascas e separadas em galho (lenho) e casca de galho, as raízes foram separadas em raiz (lenho) e casca de raiz, e os ouriços em casca de ouriço e ouriço (lenho).

Após a separação todas as amostras foram reduzidas em tamanhos menores (cortadas) e levadas à estufa a 40 °C para secagem até atingirem peso constante. Secas, as amostras foram trituradas em moinho de facas, as partes lenhosas (galho, raiz e ouriço) foram moídas em moinho industrial no Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia/INPA. Após a moagem as amostras foram pesadas, embaladas e armazenadas na geladeira até a extração.

### **3.1.2. Carapanaúba (*A. excelsum*)**

A coleta de *A. excelsum* foi realizada no dia 22 de dezembro de 2015, na Reserva Florestal Adolfo Ducke, localizada no quilometro 28 da rodovia AM 010, município de Manaus – AM. As amostras foram coletadas e processadas pelo doutorando Edizon Veiga Lopes durante o desenvolvimento da sua tese.

Foram coletadas cascas de *A. excelsum*, posteriormente higienizadas e secas em estufa climatizada a uma temperatura de 45 °C por 48 h. Após a secagem o material foi triturado em moinho de facas com intuito de aumentar a superfície de contato entre o solvente da extração e o material vegetal.

## **3.2. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS, FRAÇÕES E SUBSTÂNCIAS PURAS.**

### **3.2.1. Castanha do Brasil (*B. excelsa*)**

Os extratos de *B. excelsa* foram preparados baseado em métodos utilizados em estudos anteriores com esta espécie. Souza (2013) e Oliveira et al. (2015) relataram atividade de extratos de *B. excelsa* obtidos por extração a frio, percolação e maceração, respectivamente, em solventes de polaridade média a alta. Campos et al. (2005) relataram atividade de extratos obtidos por extração em aparelho de Soxhlet em solventes de polaridade baixa, média e alta, além da obtenção de ácido betulínico a partir destes extratos. Com base nestes relatos optou-se pela extração por maceração, por ser um método tradicional e sem riscos de degradação das amostras por aquecimento, utilizando solventes de polaridade crescente.

A extração foi realizada em pequena escala, em um período de 72 horas, com 30 minutos de agitação em banho de ultrassom após 24 e 48 h de extração. Foram utilizados 10 gramas de material vegetal para 100 mL de solvente, em um gradiente de polaridade iniciando por hexano, seguido de diclorometano (DCM), acetato de etila (AcOEt), acetona, metanol (MeOH), etanol (EtOH) e água. Em MeOH foi realizada apenas uma extração, para os demais solventes foram realizadas três extrações.

Após o período de maceração os extratos foram filtrados em papel filtro e concentrados em evaporador rotativo, sob pressão reduzida. Após evaporação completa, as amostras secas foram pesadas para cálculo do rendimento a partir da equação:  $\text{Rendimento (\%)} = (\text{massa do extrato seco obtido}) \times 100 \div (\text{massa do material vegetal extraído})$ .

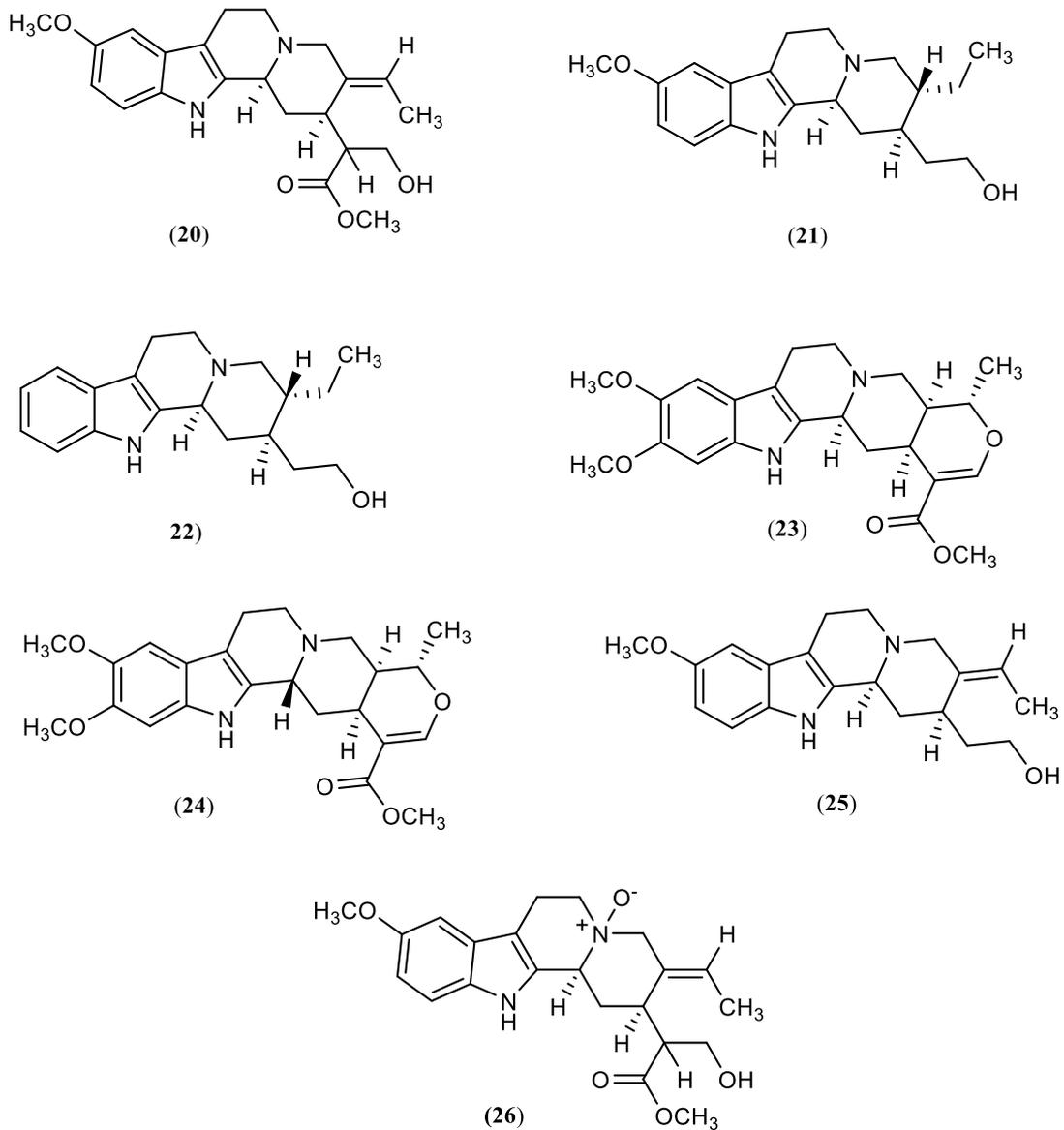
Foram preparados extratos da casca do caule, casca da amêndoa, casca de galhos, casca de ouriço, casca da raiz, entrecasca, folhas, galhos, raiz e ouriço.

### 3.2.2. Carapanaúba (*A. excelsum*)

A extração, o fracionamento e obtenção das substâncias puras isoladas de *A. marcgravianum* foram realizados pelo doutorando Edizon Veiga Lopes nas dependências do LAPAAM/INPA, e os métodos utilizados estão mais detalhados em sua tese.

Em uma breve descrição, o extrato da casca foi obtido por maceração, utilizando dois solventes orgânicos (metanol e etanol) com agitação no ultrassom. Após a extração foi realizada uma partição ácido-base para obter uma fração rica em alcaloides. A fração básica, enriquecida com alcaloides, foi submetida a uma cromatografia de coluna (CC), eluída em hexano/AcOEt (7:3), com incremento de 5% de MeOH até 100%, de onde foram obtidas dez sub-frações (Fr1-Fr10). Dessas sub-frações foram isolados os alcaloides avaliados neste estudo, elucidados através de LC-HRMS e ressonância magnética nuclear (RMN). As substâncias são 10-metoxi-15*S*,16*S*-*E*-isositsiriquina (**20**); 10-metoxi-corinan-17-ol (**21**); 3 $\alpha$ ,20 $\beta$ -corinan-17-ol (**22**); isoreserpilina (**23**), reserpilina (**24**); 3 $\alpha$ ,15 $\alpha$ -10-metoxi-geissosquizol (**25**) e *N*<sub>4</sub>-óxido-15*S*,16*S*-*E*-isositsiriquina (**26**), apresentados na figura 9. Além de uma substância inédita na literatura química, cuja estrutura estará apresentada na tese de Lopes.

Figura 9: Alcalóides indólicos isolados de *A. excelsum*



### 3.3. CULTIVO *IN VITRO* DE *Plasmodium falciparum*

A cultura *in vitro* de *P. falciparum* e os bioensaios com este parasita foram realizados no Laboratório de Cultivo de *Plasmodium falciparum* / COSAS / INPA. O método utilizado é uma modificação da técnica de Trager e Jensen (1976) adaptada pela Gerência de Malária da FMT-HVD, baseada no desenvolvimento *in vitro* dos estágios eritrocitários desta espécie parasitária.

Neste estudo foi utilizada a cepa K1 de *P. falciparum* (MRA-159, MR4, ATCC, Manassas Virginia), resistente à cloroquina e pirimetamina, cultivada em eritrócitos humanos

do tipo A+ a 37 °C, em frascos de poliestireno de 50 mL hermeticamente fechados, a uma atmosfera de baixa tensão de oxigênio (5% de CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub> e nitrogênio balanceado).

Nos frascos foram adicionados cerca de 500 µL de eritrócitos parasitados e 4,5 mL de meio RPMI 1640 (Gibco®) suplementado com NaHCO<sub>3</sub> (32 mM), Hepes (25 mM), hipoxantina (37 mM), glutamina (2 mM), glicose (10 mM), 0,4 mL de gentamicina e 10% de plasma humano inativado tipo A+. A troca do meio de cultura e a adição de mistura carbogênica foram realizadas diariamente, bem como a adição de eritrócitos sempre que a parasitemia estivesse acima de 3,0%.

O crescimento dos parasitas foi acompanhado durante a troca do meio de cultura, através de esfregaços sanguíneos corados em panótico® e observados em microscópio óptico. A parasitemia foi calculada e expressa em porcentagem a partir da contagem de 2000 eritrócitos.

Os ensaios foram realizados com culturas sincrônicas no estágio anel, trofozoítos jovens, obtidas após tratamentos com uma solução de 5% de D-sorbitol, conforme descrito por Lambros e Vanderberg (1979).

### **3.3.1. Microteste de suscetibilidade *in vitro***

O ensaio antimalárico foi realizado de acordo com o método descrito por Rieckmann et al. (1978), com adaptações descritas por Andrade-Neto et al. (2007), em condições semelhantes à cultura do parasita. Para avaliação da atividade, as amostras foram submetidas à uma triagem inicial em duas concentrações: 50 e 5 µg/mL. As amostras que apresentaram um percentual de inibição da parasitemia acima de 80% na maior concentração foram consideradas ativas e avaliadas em sete concentrações, 100 a 1,56 µg/mL, para determinação da concentração capaz de reduzir o crescimento do parasita em 50% (CI<sub>50</sub>).

As amostras foram preparadas em dimetilsulfoxido (DMSO), em soluções estoques na concentração de 10 mg/mL, e posteriormente diluídas em meio de cultura (RPMI 1640) para obtenção das concentrações para teste. Dessa forma, a concentração de DMSO nos poços de teste era ≤ 1,0%. Os antimaláricos padrões cloroquina e quinina foram avaliados em sete concentrações, 2,5 a 3,4×10<sup>-3</sup> µg/mL, como controles. Cada amostra diluída foi testada em um experimento em triplicata na triagem, e em duplicata em dois experimentos independentes para cálculo de CI<sub>50</sub>, em placas de 96 poços.

As placas testes foram preparadas de modo que cada poço recebeu a suspensão de hemácias com parasitemia inicial de 1% no estágio anel, mais a amostra a ser testada, em um volume final de 200  $\mu$ L, incubadas por 48 h a 37 °C, nas mesmas condições da cultura. Os poços contendo apenas a suspensão de hemácias e DMSO (1%) representam o controle do crescimento do parasita. Após o período de incubação foram preparados esfregaços sanguíneos para cada poço, posteriormente foram corados com panótico® e observados em microscópio óptico (1000 $\times$ ) para contagem dos parasitas. A parasitemia das amostras investigadas foi expressa em percentagem a partir da contagem de 2000 eritrócitos, a partir da equação:

$$\text{Parasitemia \%} = \text{N}^\circ \text{ total de parasitas} \times 100 \div \text{N}^\circ \text{ total de Hemácias.}$$

A concentração inibitória mediana (CI<sub>50</sub>) foi calculada com o auxílio do software GraphPad Prism 5.0, onde o efeito antiparasitário das amostras foi medido em relação ao controle de crescimento do parasita, em um intervalo de confiança de 95% (IC 95).

#### 3.4. CITOTOXICIDADE *IN VITRO*

A avaliação da toxicidade das amostras foi realizada no Laboratório de Atividade Biológica (BIOPHAR) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas / UFAM, em colaboração com a Dra. Marne Carvalho de Vasconcellos e desenvolvida pela aluna Elenn Suzany Pereira Aranha.

A linhagem celular utilizada foi a MRC-5, linhagem não neoplásica de fibroblastos humanos, cultivada em meio de cultivo DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico, em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>. As amostras foram preparadas em DMSO e diluídas em meio de cultura para o ensaio a partir de 200  $\mu$ g/mL até sete concentrações. A viabilidade celular foi avaliada através do teste do Alamar Blue, um indicador fluorescente/colorimétrico com propriedades redox que é reduzido em células em estado de proliferação. Sua forma reduzida é rósea fluorescente e indica células viáveis, já a sua forma oxidada é azul não fluorescente e indica células não viáveis.

O ensaio foi realizado conforme metodologia descrita por Ahmed et al. (1994), com o intuito de analisar a viabilidade celular das células da linhagem MRC-5 na presença de diferentes concentrações das substâncias testadas. As células foram plaqueadas em placas de 96 poços na concentração celular de 0,5 x 10<sup>4</sup> células/ poço, e incubadas por 24 h em estufa a 37 °C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Após este período as amostras previamente preparadas

foram adicionadas e a placa foi incubada por mais 48 h nas mesmas condições. O grupo controle recebeu no poço a mesma quantidade de DMSO da maior concentração das amostras (0,2%). Passado o período de incubação foram adicionados em cada poço 10 µL da solução de uso de Alamar Blue, preparada a 0,4% em meio de cultura sem soro fetal bovino, e aguardou-se mais 3 h para metabolização das células. A fluorescência foi medida usando um leitor de placas de ELISA (Beckman e Coulter®) na faixa de 540 nm de excitação e 585 nm de emissão. Os dados foram analisados em relação ao controle com o auxílio do software GraphPad Prism 5.0. A citotoxicidade em relação à atividade antiplasmódica para cada amostra foi avaliada como um índice de seletividade (IS), onde:

$$IS = CI_{50} (MRC-5) / CI_{50} (P. falciparum).$$

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As plantas estudadas são utilizadas por comunidades tradicionais para o tratamento de malária, com estudos que comprovam suas atividades. Este trabalho avaliou a atividade antimalárica de extratos de diversas partes morfológicas de *B. excelsa* e de alcaloides isolados de *A. excelsum*.

### 4.1. *Bertholletia excelsa*

Em contribuição à busca por substâncias responsáveis pela atividade antimalárica da castanheira, foram preparados extratos de diversas partes da planta e avaliados *in vitro* contra *P. falciparum*. Essa triagem auxiliou no direcionamento do estudo fitoquímico no projeto de doutorado de Diana Sangama (PPGBIOTEC/UFAM).

#### 4.1.1. Rendimento das extrações

Foram preparados setenta extratos de resíduos de castanha-do-Brasil, obtidos a partir de dez partes da planta extraídas por maceração em sete solventes em um gradiente de polaridade. Foram realizadas três extrações em cada solvente, exceto MeOH, e o material vegetal utilizado foi o mesmo para todos os solventes. A massa dos extratos secos e o rendimento das extrações estão apresentados na tabela 1.

Os rendimentos foram calculados a partir da massa dos extratos secos em relação à massa do material vegetal utilizado na extração. A partir desses valores é possível observar maior rendimento das extrações conforme aumenta a polaridade dos solventes. Para todas as partes da planta os extratos obtidos em solventes mais polares (acetona, EtOH, MeOH e H<sub>2</sub>O) apresentaram maior teor extrativo.

Entre os extratos com melhores rendimentos destacam-se os extratos MeOH, em sua maioria. Estudos anteriores sobre esta planta mostram melhores rendimentos de extratos obtidos em solventes mais polares, como os extratos da casca de *B. excelsa* obtidos por Campos et al. (2005), extraídos em hexano, AcOEt, EtOH e MeOH, sequencialmente. Destes, o extrato EtOH apresentou melhor rendimento entre os demais. O método de extração utilizado nesse estudo foi a quente em Soxhlet, diferente do método adotado no presente trabalho.

Tabela 1: Massa dos extratos secos de *B. excelsa* e seus respectivos rendimentos a partir do material vegetal utilizado

| Partes Planta      | Material vegetal utilizado (g) | Extratos secos (mg) / Rendimento (%) |             |      |             |       |             |         |            |       |            |      |            |                  |            |
|--------------------|--------------------------------|--------------------------------------|-------------|------|-------------|-------|-------------|---------|------------|-------|------------|------|------------|------------------|------------|
|                    |                                | Hex                                  |             | DCM  |             | AcOEt |             | Acetona |            | MeOH  |            | EtOH |            | H <sub>2</sub> O |            |
|                    |                                | (mg)                                 | (%)         | (mg) | (%)         | (mg)  | (%)         | (mg)    | (%)        | (mg)  | (%)        | (mg) | (%)        | (mg)             | (%)        |
| Casca do caule     | 10,7                           | 65,5                                 | <b>0,6</b>  | 36,8 | <b>0,3</b>  | 207   | <b>1,9</b>  | 1.789   | <b>16</b>  | 826   | <b>7,7</b> | 276  | <b>2,5</b> | 192              | <b>1,8</b> |
| Casca da amêndoa   | 10,7                           | 42,7                                 | <b>0,3</b>  | 40,8 | <b>0,4</b>  | 22,7  | <b>0,2</b>  | 35,0    | <b>0,3</b> | 47,6  | <b>0,4</b> | 25,5 | <b>0,4</b> | 121              | <b>1,1</b> |
| Casca de galho     | 10,7                           | 187                                  | <b>1,7</b>  | 60,3 | <b>0,5</b>  | 70,7  | <b>0,6</b>  | 729     | <b>6,7</b> | 1.084 | <b>10</b>  | 442  | <b>4,1</b> | 513              | <b>4,7</b> |
| Casca da raiz      | 10,3                           | 222                                  | <b>2,1</b>  | 242  | <b>2,3</b>  | 102   | <b>1,0</b>  | 727     | <b>7,0</b> | 758   | <b>7,3</b> | 391  | <b>3,7</b> | 400              | <b>3,8</b> |
| Casca do ouriço    | 10,4                           | 96,4                                 | <b>0,9</b>  | 27,5 | <b>0,2</b>  | 16,5  | <b>0,1</b>  | 36,0    | <b>0,3</b> | 56,8  | <b>0,5</b> | 26,9 | <b>0,2</b> | 129              | <b>1,2</b> |
| Entrecasca (caule) | 10,7                           | 87,5                                 | <b>0,8</b>  | 114  | <b>1,0</b>  | 48,5  | <b>0,4</b>  | 1.355   | <b>12</b>  | 1.071 | <b>10</b>  | 665  | <b>6,2</b> | 566              | <b>5,3</b> |
| Folhas             | 10,7                           | 187                                  | <b>1,7</b>  | 62,3 | <b>0,6</b>  | 44,2  | <b>0,4</b>  | 263     | <b>2,4</b> | 982   | <b>9,2</b> | 451  | <b>4,2</b> | 520              | <b>4,8</b> |
| Galhos             | 10,3                           | 32,2                                 | <b>0,3</b>  | 31,8 | <b>0,3</b>  | 44,1  | <b>0,4</b>  | 257     | <b>2,5</b> | 278   | <b>2,7</b> | 134  | <b>1,3</b> | 164              | <b>1,6</b> |
| Ouriço             | 10,0                           | 6,20                                 | <b>0,06</b> | 9,40 | <b>0,09</b> | 5,60  | <b>0,06</b> | 16,2    | <b>0,1</b> | 37,0  | <b>0,4</b> | 29,7 | <b>0,3</b> | 176              | <b>1,7</b> |
| Raiz               | 10,0                           | 23,6                                 | <b>0,2</b>  | 20,5 | <b>0,2</b>  | 29,4  | <b>0,3</b>  | 355     | <b>3,5</b> | 355   | <b>3,5</b> | 164  | <b>1,6</b> | 128              | <b>1,3</b> |

Nota: Solventes extratores: AcOEt (acetato de etila); DCM (diclorometano); EtOH (etanol); Hex (hexano); MeOH (metanol).

Em seu estudo sobre a atividade antimalárica de extratos da casca e do ouriço de *B. excelsa*, Souza (2013) relatou melhor rendimento dos extratos etanólicos para as duas partes da planta. Ressaltando que em seu trabalho não foram realizadas extrações com outros solventes de menor polaridade, apenas em EtOH e H<sub>2</sub>O por percolação a frio.

Para verificar a presença de classes de metabólitos na planta, Souza (2013) avaliou os extratos e frações através de testes rápidos, que revelaram a presença de triterpenos, flavonoides, fenóis e taninos, principalmente em extratos e frações da casca. Entre os metabólitos presentes em espécies de Lecythidaceae, os triterpenos, ácidos fenólicos e flavonoides são encontrados com maior frequência na família (CAMPOS et al., 2005; JOHN e SHAHIDI, 2010; ALMEIDA et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2012; TAVARES, 2014).

Os extratos avaliados por Oliveira et al. (2015) foram obtidos em extração a frio por maceração apenas com EtOH para as cascas, e H<sub>2</sub>O para extração da entrecasca. Apesar das diferenças nos métodos de extração, os extratos EtOH, em geral, apresentaram melhores rendimentos neste estudo, mostrando maior polaridade das substâncias presentes nesta planta.

#### **4.1.2. Atividade antimalárica *in vitro***

Os extratos obtidos foram submetidos a uma triagem inicial frente à cepa K1 (cloroquina resistente) de *P. falciparum*, para avaliação da atividade antimalárica *in vitro* em duas concentrações (50 e 5,0 µg/mL). Os percentuais de inibição dos extratos estão apresentados na tabela 2. Neste primeiro ensaio, as amostras que apresentaram inibição da parasitemia na maior concentração igual ou superior a 80% foram consideradas potencialmente ativas, as que apresentaram inibição abaixo de 80% foram consideradas inativas.

Dos setenta extratos avaliados, os extratos obtidos em solventes mais polares e com maior rendimento apresentaram maior atividade, ocorrendo um aumento da inibição da parasitemia conforme o rendimento dos extratos. As partes da planta com melhores percentuais de inibição da parasitemia foram casca do caule, casca de galhos, casca da raiz, entrecasca e raiz, onde os extratos da entrecasca em AcOEt, acetona, MeOH, EtOH e H<sub>2</sub>O apresentaram atividade nas duas concentrações, o que também ocorreu com os extratos AcOEt, acetona, MeOH e EtOH de casca do caule e casca da raiz, além de extratos acetônicos

Tabela 2: Triagem de extratos de *B. excelsa* frente à estirpe K1 de *Plasmodium falciparum*.

| Partes Planta      | Inibição (%) de <i>P. falciparum</i> <i>in vitro</i> por extratos a 50 e 5,0 µg/mL |     |     |     |           |           |           |           |           |           |           |           |                  |           |
|--------------------|--|-----|-----|-----|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------------|-----------|
|                    | Hexano   |     | DCM |     | AcOEt     |           | Acetona   |           | MeOH      |           | EtOH      |           | H <sub>2</sub> O |           |
|                    | 50   | 5,0 | 50  | 5,0 | 50        | 5,0       | 50        | 5,0       | 50        | 5,0       | 50        | 5,0       | 50               | 5,0       |
| Casca do caule     | 75   | 4,7 | 88  | 10  | <b>80</b> | <b>79</b> | <b>93</b> | <b>88</b> | <b>93</b> | <b>87</b> | <b>92</b> | <b>91</b> | 93               | 16        |
| Casca da amêndoa   | 60   | 0,0 | 50  | 0,0 | 80        | 0,0       | 92        | 4,1       | 89        | 6,3       | 89        | 0,0       | 12               | 3,5       |
| Casca de galho     | 72   | 18  | 78  | 34  | <b>81</b> | <b>77</b> | <b>92</b> | <b>86</b> | 91        | 29        | <b>91</b> | <b>83</b> | 92               | 0,6       |
| Casca de raiz      | 52   | 9,0 | 84  | 0,0 | <b>79</b> | <b>77</b> | <b>92</b> | <b>88</b> | <b>93</b> | <b>89</b> | <b>92</b> | <b>86</b> | 93               | 18        |
| Casca de ouriço    | 27   | 0,0 | 14  | 7,3 | <b>77</b> | <b>46</b> | 80        | 21        | 68        | 0,5       | 83        | 5,7       | 6,2              | 4,0       |
| Entrecasca (caule) | 67   | 0,0 | 86  | 30  | <b>81</b> | <b>71</b> | <b>92</b> | <b>92</b> | <b>91</b> | <b>57</b> | <b>93</b> | <b>67</b> | <b>92</b>        | <b>82</b> |
| Folhas             | 12   | 4,5 | 80  | 7,4 | 76        | 0,0       | 90        | 16        | 91        | 0,0       | 91        | 14        | 76               | 9,8       |
| Galhos             | 73   | 4,5 | 88  | 5,0 | <b>79</b> | <b>39</b> | <b>89</b> | <b>86</b> | 92        | 18        | 90        | 6,8       | 90               | 0,8       |
| Ouriço             | 88   | 24  | 85  | 0,0 | 85        | 0,0       | <b>89</b> | <b>46</b> | 89        | 16        | 89        | 2,0       | 54               | 0,4       |
| Raiz               | 49   | 0,0 | 61  | 0,0 | <b>77</b> | <b>41</b> | <b>92</b> | <b>86</b> | <b>90</b> | <b>35</b> | 93        | 16        | 91               | 0,0       |

Nota: Solventes extratores: AcOEt (cetato de etila); DCM (diclorometano); EtOH (etanol); MeOH (metanol). As amostras com valores destacados em negrito foram priorizadas para determinação de CI<sub>50</sub>.

de galhos e raiz. Das demais partes da planta, os extratos de casca da amêndoa, casca do ouriço, folhas e ouriço apresentaram melhores percentuais de inibição apenas na maior concentração (50 µg/mL).

Devido às limitações no método de quantificação dos parasitas, que se deu através da contagem e avaliação morfológica por microscopia, para a determinação da  $CI_{50}$  foram priorizadas as amostras que apresentaram atividade nas duas concentrações e que estão destacadas em negrito na tabela 2. Estas amostras passaram por diluições seriadas e foram testadas nas concentrações de 100 a 1, 56 µg/mL, e os valores das  $CI_{50}$  estão apresentados na tabela 3. Os critérios utilizados para classificação da atividade dos extratos brutos estão de acordo com os definidos na literatura (KRETTLI et al., 2009).

Para extratos brutos:

- $CI_{50} > 25 \text{ µg/mL} = \text{inativo (I)}$
- $25 \text{ µg/mL} \leq CI_{50} < 10 \text{ µg/mL} = \text{parcialmente ativo (PA)}$
- $10 \text{ µg/mL} \leq CI_{50} < 1,0 \text{ µg/mL} = \text{ativo (A)}$
- $CI_{50} \leq 1,0 \text{ µg/mL} = \text{muito ativo (MA)}$

A partir dos valores de  $CI_{50}$  podemos confirmar a alta atividade inibitória da casca do caule de *B. excelsa*, com melhor atividade encontrada para o extrato EtOH, com  $CI_{50}$  igual a 0,78 µg/mL sendo considerado muito ativo. Souza (2013) mostrou a atividade do extrato EtOH e da fração AcOEt da casca contra a cepa 3D7 de *P. falciparum* (cloroquina sensível), com  $CI_{50}$  igual a 6,0 e 0,1 µg/mL, respectivamente. Em seu estudo com plantas utilizadas por comunidades quilombolas contra a malária, Oliveira et al. (2015) demonstraram a atividade do extrato EtOH desta parte da planta com  $CI_{50}$  igual a 2,0 µg/mL frente a cepa W2 de *P. falciparum* (cloroquina resistente), resultados que corroboram com os aqui obtidos. Os demais extratos da casca do caule (AcOEt, acetona e MeOH) apresentaram  $CI_{50}$  entre 1,52 e 2,79 µg/mL.

Tabela 3: Concentração inibitória (CI<sub>50</sub>) de extratos de *B. excelsa* frente à cepa K1 de *P. falciparum*.

| CI <sub>50</sub> (µg/mL) <i>P. falciparum</i> / Classificação da atividade (CA) |                  |    |                  |    |                  |    |                  |           |
|---|------------------|----|------------------|----|------------------|----|------------------|-----------|
| Partes Planta   | AcOEt            |    | Acetona          |    | MeOH             |    | EtOH             |           |
|   | CI <sub>50</sub> | CA        |
| <b>Casca do caule</b>   | 1,52             | A  | 2,79             | A  | 2,27             | A  | <b>0,78</b>      | <b>MA</b> |
| <b>Casca de galho</b>   | 5,94             | A  | 2,43             | A  | ND               | -  | 3,07             | A         |
| <b>Casca de raiz</b>  | 2,13             | A  | 2,26             | A  | 3,28             | A  | 3,01             | A         |
| <b>Casca de ouriço</b>  | 12,9             | PA | ND               | -  | ND               | -  | ND               | -         |
| <b>Entrecasca (caule)</b>   | 2,26             | A  | 2,37             | A  | 4,55             | A  | 2,15             | A         |
| <b>Galhos</b>   | 11,0             | PA | 2,11             | A  | ND               | -  | ND               | -         |
| <b>Ouriço</b>   | ND               | -  | 6,10             | A  | ND               | -  | ND               | -         |
| <b>Raiz</b>   | 5,44             | A  | 2,77             | A  | 6,56             | A  | ND               | -         |

Nota: Solventes extratores: AcOEt (acetato de etila), EtOH (etanol), MeOH (metanol). CA (classificação da atividade). A (ativo), PA (parcialmente ativo), MA (muito ativo), ND (não determinado).

A entrecasca apresentou atividade nos extratos AcOEt, acetona, MeOH, EtOH e H<sub>2</sub>O, com melhor atividade do extrato etanólico (CI<sub>50</sub> 2,14 µg/mL). O extrato aquoso, relatado como seiva no trabalho de Oliveira et al. (2015) que realizou a extração de amostras frescas desta parte da planta e relatou CI<sub>50</sub> de 7,5 µg/mL frente a cepa W2 de *P. falciparum*, neste estudo apresentou CI<sub>50</sub> igual a 3,81 µg/mL. Já o ouriço apresentou melhor atividade na extração em acetona, com CI<sub>50</sub> igual a 6,10 µg/mL, conforme Souza (2013) já havia relatado atividade da fração acetona do extrato etanólico com CI<sub>50</sub> igual a 10 µg/mL frente a cepa 3D7 *P. falciparum*.

O extrato de AcOEt da casca do ouriço apresentou melhor inibição da parasitemia com CI<sub>50</sub> igual a 12,9 µg/mL. Para esta parte da planta, Oliveira et al. (2015) reportaram atividade do extrato etanólico com CI<sub>50</sub> igual a 4,5 µg/mL contra a cepa W2 de *P. falciparum*. A

atividade antimalárica das partes lenhosas (raiz e galhos) está sendo relatada pela primeira vez neste estudo, onde os extratos acetônicos destas partes da planta apresentaram melhor atividade, com  $CI_{50}$  de 2,77 e 2,11  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente.

Os extratos de *B excelsa* apresentaram atividade antimalárica promissora. Apesar de o seu efeito antiplasmódico ser conhecido, as substâncias responsáveis por esta atividade ainda não foram isoladas e avaliadas. Entre as substâncias já identificadas em partes da planta, o ácido elágico e seus derivados estão entre os prováveis responsáveis pelo seu potencial biológico, visto que esse grupo de substâncias apresenta atividade biológica conhecida, incluindo a atividade antimalárica (SOH et al., 2008; FOTIE, 2010).

Os achados neste estudo justificam o uso desta planta no tratamento da malária por comunidades tradicionais da Amazônia. A busca pelas substâncias responsáveis pela atividade antimalárica de *B excelsa* terá continuidade durante a tese de doutorado de Diana Sangama.

#### 4.2. *Aspidosperma excelsum*

Foram avaliados o extrato metanólico da casca (2EMCMS 2%), as frações ácida (2F.AcOEt-A), básica (2F.AcOEt-B), clorofórmica (2F. $\text{CHCl}_3$ ) e aquosa (2F. $\text{H}_2\text{O}$ ), além dos alcaloides: 10-metoxi-isositsiriquina, 10-metoxi-diidrocorinanteol, diidrocorinanteol,  $\alpha$  e  $\beta$ -reserpilina, 10-metoxi-geissoschizol, *N*-óxido-isositsiriquina e um novo composto sugerido (2FBC-4-A), frente a cepa K1 (cloroquina resistente) de *P. falciparum*.

Os valores de  $CI_{50}$  foram gerados em dois experimentos independentes, para a maioria das amostras, e estão apresentados nas tabelas 4 e 5, onde também apresentamos os  $CI_{50}$  frente à linhagem normal de fibroblastos humanos (MRC-5) e seus respectivos índices de seletividade (IS).

Entre o extrato e as frações (tab 4), a fração 2F.AcOEt-B apresentou maior atividade antiplasmódica, com  $CI_{50}$  igual a 2,53  $\mu\text{g/mL}$  contra *P. falciparum*, e maior toxicidade comparada às outras amostras avaliadas, com  $CI_{50}$  igual a 53.3  $\mu\text{g/mL}$  frente à linhagem celular MRC-5. Esta fração é concentrada em alcaloides e dela foram obtidas algumas das substâncias avaliadas neste estudo, o que explica sua melhor atividade antimalárica e maior toxicidade em relação às demais. Ainda assim, de acordo com Suffness e Pezzuto (1990), são consideradas amostras com citotoxicidade elevada apenas as que possuem  $CI_{50}$  inferior a 30  $\mu\text{g/mL}$ .

Tabela 4: Tabela 4: Atividade antimalárica e citotóxica do extrato e frações de *A. excelsum*

| Amostras             | CI <sub>50</sub> e IC <sub>95</sub> <i>P. falciparum</i> e MRC-5 |           |                       | IS    |
|----------------------|--|-----------|-----------------------|-------|
|                      | <i>P.f</i> (µg/mL)   | Atividade | MRC-5 (µg/mL)         |       |
| 2EMCMS (2%)          | 5,24<br>(3,78 – 7,27)  | A         | 159<br>(137 – 184)    | 30,3  |
| 2F.AcOEt-A           | 5,35<br>(3,77 – 7,58)  | A         | 109<br>(94,9 – 124)   | 20,4  |
| 2F.AcOEt-B           | 2,53<br>(2,08 – 3,07)  | A         | 53,3<br>(47,7 – 59,5) | 21,1  |
| 2F.CHCl <sub>3</sub> | 6,16<br>(4,00 - 9,49)  | A         | >200                  | >32,5 |
| 2.FH <sub>2</sub> O  | > 50   | I         | NT                    | -     |

Nota: A (ativo), I (inativo), IS (índice de seletividade), NT (não testado).

O extrato metanólico e as frações 2F.AcOEt-A e 2F.CHCl<sub>3</sub> apresentaram CI<sub>50</sub> ente 5,24 e 6,16 µg/mL, sendo considerados ativos. Rocha e Silva (2014) relatou atividade do extrato MeOH da casca de *A. excelsum* (citada como *A. marcgravianum* erroneamente) (CI<sub>50</sub> 0,30 µg/mL) e da fração clorofórmica (CI<sub>50</sub> 15,7 µg/mL) frente a cepa W2 de *P. falciparum*. Quanto à citotoxicidade, a fração clorofórmica apresentou CI<sub>50</sub> superior a 200 µg/mL, não sendo considerada citotóxica no tempo e concentrações testadas. O extrato e a fração ácida, apesar de terem suas CI<sub>50</sub> determinadas, não apresentam elevada citotoxicidade.

Os alcaloides indólicos foram ensaiados para atividade antimalárica *in vitro* e seus valores de CI<sub>50</sub> estão apresentados na tabela 5, com classificação de atividade de acordo com Rocha e Silva (2014), onde:

Para substâncias puras:

- CI<sub>50</sub> > 20 µM = inativo
- 20 µM ≤ CI<sub>50</sub> > 5,0 µM = atividade moderada
- 5,0 µM ≤ CI<sub>50</sub> > 0,1 µM = ativo
- CI<sub>50</sub> ≤ 0,1 µM = muito ativo

Tabela 5: Atividade antimalárica e citotóxica de alcaloides isolados de *A. excelsum*

| Substâncias  | CI <sub>50</sub> e IC <sub>95</sub> <i>P. falciparum</i> (Pf) e MRC-5 |                          |                      | IS                 |      |
|--|---|--------------------------|----------------------|--------------------|------|
|  | Pf (µg/mL)  | Pf (µM)                  | Atividade MRC-5 (µM) |                    |      |
| 10-metoxi-15 <i>S</i> ,16 <i>S</i> - <i>E</i> -<br>isositsiriquina ( <b>20</b> )       | 3,93<br>(3,28 – 4,71)   | 10,3<br>(8,57 – 12,3)    | AM                   | >523<br>>50,9      |      |
| 10-metoxi- corinan-17-ol<br>( <b>21</b> )  | 4,59<br>(4,27 – 4,97)   | 13,9<br>(13,0 – 15,1)    | AM                   | 463<br>(407 - 527) | 33,3 |
| 3α, 20β-Corinan-17-ol ( <b>22</b> )  | 3,72<br>(3,15 - 4,10)   | 12,5<br>(10,5 – 13,7)    | AM                   | 325<br>(260 – 407) | 26,1 |
| Isoreserpilina ( <b>23</b> )   | 7,71<br>(5,28 – 11,3)   | 18,7<br>(12,8 – 27,4)    | AM                   | 156<br>(138 – 175) | 8,34 |
| Reserpilina ( <b>24</b> )  | 7,43<br>(5,47 – 10,0)   | 18,0<br>(13,3 – 24,2)    | AM                   | 312<br>(279 – 349) | 17,3 |
| 3α,15α -10-metoxi-<br>geissosquizol ( <b>25</b> )                                      | 7,71<br>(6,82 – 8,72)   | 23,6<br>(20,9 – 26,7)    | I                    | 486<br>(190 – 556) | 20,6 |
| <i>N</i> -óxido-15 <i>S</i> ,16 <i>S</i> - <i>E</i> -<br>isositsiriquina ( <b>26</b> ) | 29,2<br>(26,7 – 32,0)   | 78,9<br>(72,1 – 86,4)    | I                    | NT                 | -    |
| 2FBC-4-A   | 15,2<br>(13,2 – 17,5)   | 38,2<br>(33,1 – 43,9)    | I                    | NT                 | -    |
| Cloroquina Difosfato   | 0,182<br>(0,099 – 0,334)  | 0,353<br>(0,191 – 0,647) | Controle             | NT                 | -    |
| Hidrocloridrato de Quinina   | 0,138<br>(0,073 – 0,257)  | 0,348<br>(0,183 – 0,647) | Controle             | NT                 | -    |

Nota: AM (atividade moderada), I (inativo), IS (índice de seletividade), NT (não testado)

Entre os alcaloides, cinco apresentaram atividade moderada contra *P. falciparum*. Destes o 10-metoxi-15*S*,16*S*-*E*-isositsiriquina (**20**) apresentou menor  $CI_{50}$  (10,3  $\mu$ M) e não se mostrou citotóxico nas concentrações testadas, com  $CI_{50}$  superior a 523  $\mu$ M (>200  $\mu$ g/mL) para a linhagem MRC-5. Este é o primeiro relato de atividade antiplasmódica para esta substância.

Os alcaloides 10-metoxi-corinan-17-ol (**21**) e 3 $\alpha$ ,20 $\beta$ -corinan-17-ol (**22**) apresentaram  $CI_{50}$  igual a 13,9 e 12,5  $\mu$ M, respectivamente. Essas substâncias, que diferem apenas pela presença de uma metoxila, apresentam  $CI_{50}$  superior a 1,0  $\mu$ g/mL, conforme Passemar et al. (2011) avaliaram, frente a estirpe FcM29 (cloroquina resistente) de *P. falciparum*, dados que corroboram com os aqui relatados. Quando comparados os valores de  $CI_{50}$  entre MRC-5 e *P. falciparum*, o índice de seletividade (IS) nos mostra que essas substâncias são mais seletivas ao parasita que às células normais, indicando baixa citotoxicidade.

As substâncias isoreserpilina (**23**) e reserpilina (**24**) também apresentaram atividade aproximada, com  $CI_{50}$  entre 18,0  $\mu$ M. Essas moléculas diferem apenas na configuração estrutural de suas estruturas. A reserpilina possui atividade biológica reconhecida, como ação antibacteriana e sinérgica contra estirpes resistentes de *Escherichia coli* (DWIVEDI et al., 2015), atividade antitumoral e antipsicótica (YU et al., 2013; SRIVASTAVA et al., 2015), e atividade antiplasmódica com  $CI_{50}$  superior a 1,0  $\mu$ g/mL, de acordo com Passemar et al. (2011). Quanto à citotoxicidade, apresentou  $CI_{50}$  entre 156 e 312  $\mu$ M, mas os menores valores de IS (9,4 e 16,1) indicam menor seletividade quando comparadas aos outros alcaloides.

Os demais alcaloides foram considerados inativos neste estudo, com  $CI_{50}$  superior a 20  $\mu$ M. O 3 $\alpha$ ,15 $\alpha$ -10-metoxi-geissosquizol (**25**) apresentou  $CI_{50}$  igual a 23,6  $\mu$ M contra *P. falciparum*. Esta substância foi avaliada por Aguiar et al. (2015) frente à estirpe W2 de *P. falciparum*, onde apresentou atividade com  $CI_{50}$  de 1,0  $\mu$ g/mL. Neste estudo também foi avaliada a citotoxicidade dessa substância em células tumorais HepG2 ( $CI_{50}$  5,0  $\mu$ g/mL) e em uma linhagem normal (BGM) ( $CI_{50}$  8,0  $\mu$ g/mL), sendo considerada tóxica para estas linhagens celulares. Para a linhagem MRC-5, avaliada no presente estudo, apresentou  $CI_{50}$  igual a 486  $\mu$ M, com IS de 16,9 mais seletiva para o parasita que para as células normais, não sendo considerada tóxica para esta linhagem celular.

O alcaloide *N*-óxido-15*S*,16*S*-*E*-isositsiriquina (**26**) apresentou maior  $CI_{50}$ , sem relatos na literatura para atividade biológica, podendo ser avaliado quanto a outras propriedades biológicas. A substância 2FBC-4-A também foi considerado inativa neste estudo contra *P.*

*falciparum*, podendo apresentar outras propriedades biológicas ainda a serem descobertas. Esta última, é uma molécula inédita na literatura química e sua estrutura será apresentada na tese de Edizon Lopes.

Apesar da atividade *in vitro* dos alcaloides ser considerada moderada, estudos *in vivo* devem ser realizados para melhor definição da atividade antimalárica dessas substâncias, uma vez que em modelos *in vivo* é possível avaliar a absorção e o metabolismo dessas substâncias no organismo. Este estudo contribuiu para o conhecimento sobre o potencial biológico das espécies estudadas, amplamente utilizadas por comunidades tradicionais para o tratamento da malária.

## CONCLUSÃO

- Os extratos avaliados de *B. excelsa* apresentaram boa atividade, onde o extrato etanólico da casca apresentou atividade antiplasmódica promissora;
- Estudos da composição química dos extratos de *B. excelsa* estão em andamento em outro projeto de tese e devem revelar as substâncias responsáveis pela atividade antimalárica;
- De *A. excelsum*, a fração básica e o alcaloide 10-metoxiisosistsiriquina apresentaram melhor atividade antimalárica;
- Estudos *in vivo* com os alcaloides merecem ser realizados para melhor definição do potencial antimalárico destas substâncias.

## REFERÊNCIAS

ACHAN, J. et al. Quinine, an old anti-malarial drug in a modern world: role in the treatment of malaria. **Malaria Journal**, [s.l.], v. 10, n. 1, p.144-155, 2011. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/1475-2875-10-144>.

AGROPECUÁRIA ARUANÃ S/A. Fazenda Aruanã, Itacoatiara, Amazonas, Brasil. Disponível em: <<https://agropecuariaaruana.wordpress.com/>>. Acesso em 16 de 03 de 2017.

AGUIAR, A. C. C et al. *Aspidosperma* (Apocynaceae) plant cytotoxicity and activity towards malaria parasites. Part II: experimental studies with *Aspidosperma ramiflorum* *in vivo* and *in vitro*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s.l.], v. 110, n. 7, p.906-913, nov. 2015. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/0074-02760150188>.

AHMED, S. A; GOGAL, R. M.; WALSH, J. E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation assay. **Journal of Immunological Methods**, [s.l.], v. 170, n. 2, p.211-224, abr. 1994. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759\(94\)90396-4](http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759(94)90396-4).

ALBUQUERQUE, B. W. P. Contribuição ao conhecimento das *Aspidosperma* da Amazônia Brasileira (Apocynaceae). *Aspidosperma carapanauba* Pichon, *A. mascgravianum* Woodson e *A. oblongum* A. DC. **Acta Amazonica**, [s.l.], v. 1, n. 3, p.9-20, dez. 1971. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1809-43921971013009>.

ALECRIM, M. G. **Estudo da resistência do *P. falciparum* às drogas antimaláricas "in vitro" e "in vivo" na Amazônia**. 1981. Dissertação de mestrado - Universidade de Brasília, Brasília.

ANDRADE-NETO, Valter F. et al. *In vitro* inhibition of *Plasmodium falciparum* by substances isolated from Amazonian antimalarial plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s.l.], v. 102, n. 3, p.359-366, jun. 2007. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0074-02762007000300016>.

AÑEZ, R. B. S. **Análise morfoanatómica das folhas e casca de *Aspidosperma nitidum* Benth e *Aspidosperma marcgravianum* Woodson (Apocynaceae) com abordagem**

**farmacognóstica e etnofarmacológica.** 2009. 115 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais, INPA/UFAM, Manaus, 2009.

BRAGA, E. M; FONTES, C. J. F. *Plasmodium* - Malária. In: NEVES, D. P et al (org.). **Parasitologia Humana.** 11. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2010. Cap. 17. p. 143-161.

BRANDÃO, M. G. L. et al. Brazilian medicinal plants described by 19th century European naturalists and in the Official Pharmacopoeia. **Journal of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 120, n. 2, p.141-148, nov. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2008.08.004>.

BRANDÃO, M. G. L. et al. Survey of medicinal plants used as antimalarials in the Amazon. **Journal of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 36, n. 2, p.175-182, abr. 1992. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0378-8741\(92\)90018-m](http://dx.doi.org/10.1016/0378-8741(92)90018-m).

BRASIL, Decreto nº 51.209, de 18 de agosto de 1961. Aprova as novas especificações para a classificação e fiscalização da exportação da Castanha-do-Brasil. Brasília/DF: Diário Oficial de Brasília, p. 853-855, 1961.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim epidemiológico. Malária: Monitoramento dos casos no Brasil em 2014.** v. 16, n. 25. Brasil, 2015.

BRASIL. **Portal da Saúde.** Disponível em: ([https://public.tableau.com/profile/mal.ria.brasil#!/vizhome/MiniSivep1517\\_2018\\_02\\_01/casos\\_notificados\\_2017\\_regio\\_Amaznica](https://public.tableau.com/profile/mal.ria.brasil#!/vizhome/MiniSivep1517_2018_02_01/casos_notificados_2017_regio_Amaznica)). Acesso em 17 de fevereiro de 2018.

BRASIL. **Portal da Saúde.** Disponível em: ([https://public.tableau.com/profile/mal.ria.brasil#!/vizhome/MiniSivep1518\\_2018\\_08\\_15/casos\\_notificados\\_2018\\_regio\\_Amaznica](https://public.tableau.com/profile/mal.ria.brasil#!/vizhome/MiniSivep1518_2018_08_15/casos_notificados_2018_regio_Amaznica)). Acesso em 20 de agosto de 2018.

CAMPOS, F. R. et al. Trypanocidal activity of extracts and fractions of *Bertholletia excelsa*. **Fitoterapia**, [s.l.], v. 76, n. 1, p.26-29, jan. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2004.09.008>.

CASTELLO, A.C.D.; PEREIRA, A.S.S.; SIMÕES, A.O.; KOCH, I. *Aspidosperma* in **Flora e Funga do Brasil.** Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB33616>>. Acesso em 15 de julho 2018.

CASTRO, V; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II**. 2 ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008.

CHEHUAN, Y. F. et al. *In vitro* chloroquine resistance for *Plasmodium vivax* isolates from the Western Brazilian Amazon. **Malaria Journal**, [s.l.], v. 12, n. 1, p.226-230, 2013. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/1475-2875-12-226>.

COELHO-FERREIRA, M. Medicinal knowledge and plant utilization in an Amazonian coastal community of Marudá, Pará State (Brazil). **Journal of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 126, n. 1, p.159-175, out. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2009.07.016>.

CRUZ, L. R. et al. Malaria in South America: a drug discovery perspective. **Malaria Journal**, [s.l.], v. 12, n. 1, p.168-179, 2013. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/1475-2875-12-168>.

CUNICO, W. et al. Fármacos antimalariais-história e perspectivas. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 89, n. 1, p. 49-55, 2008.

DUKE, J. A; VASQUEZ, R. **Amazonian ethnobotanical dictionary**. Florida: CRC Press, 1. Ed, 1994.

DWIVEDI, G. R. et al. Synergy potential of indole alkaloids and its derivative against drug-resistant *Escherichia coli*. **Chemical Biology & Drug Design**, [s.l.], v. 86, n. 6, p.1471-1481, 21 ago. 2015. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/cbdd.12613>.

FERREIRA, I. D. et al. *In vitro* assessment of artesunate, artemether and amodiaquine susceptibility and molecular analysis of putative resistance-associated mutations of *Plasmodium falciparum* from São Tomé and Príncipe. **Tropical Medicine & International Health**, [s.l.], v. 12, n. 3, p.353-362, 18 jan. 2007. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3156.2006.01789.x>.

FOTIE, J. The potential of ellagic acid as a possible antimalarial drug candidate. **Current Bioactive Compounds**, [s.l.], v. 6, n. 3, p.161-177, 1 set. 2010. Bentham Science Publishers Ltd. <http://dx.doi.org/10.2174/157340710793237344>.

FRATUS, A. S. B. **Expressão e reconhecimento imune de alelos conservados de antígenos variantes de *Plasmodium falciparum***. 2008. 98 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-

graduação em Biologia da Relação Patógeno-hospedeiro, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

FRAUSIN, G. et al. An ethnobotanical study of anti-malarial plants among Indigenous people on the upper Negro River in the Brazilian Amazon. **Journal of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 174, p.238-252, nov. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2015.07.033>.

GONÇALVES, J. F. C. et al. Primary metabolism components of seeds from Brazilian Amazon tree species. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, [s.l.], v. 14, n. 2, p.139-142, ago. 2002. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1677-04202002000200009>.

HIDALGO, A. F. **Plantas de uso popular para tratamento da malária e males associados da área de influência do rio Solimões e Região de Manaus-AM**. 2003. Tese de Doutorado em agronomia, Programa de pós-graduação em Agronomia (Horticultura), UNESP, Botucatu.

JAMBOU, R. et al. Resistance of *Plasmodium falciparum* field isolates to *in-vitro* artemether and point mutations of the SERCA-type PfATPase6. **The Lancet**, [s.l.], v. 366, n. 9501, p.1960-1963, dez. 2005. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(05\)67787-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(05)67787-2).

JOHN, J. A.; SHAHIDI, F. Phenolic compounds and antioxidant activity of Brazil nut (*Bertholletia excelsa*). **Journal of Functional Foods**, [s.l.], v. 2, n. 3, p.196-209, jul. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2010.04.008>.

KRETTLI, A; ADEBAYO, J; KRETTLI, L. Testing of Natural Products and Synthetic Molecules Aiming at New Antimalarials. **Current Drug Targets**, [s.l.], v. 10, n. 3, p.261-270, 1 mar. 2009. Bentham Science Publishers Ltd. <http://dx.doi.org/10.2174/138945009787581203>.

LAMBROS, C; VANDERBERG, J. P. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. **The Journal of Parasitology**, [s.l.], v. 65, n. 3, p.418-420, jun. 1979. JSTOR. <http://dx.doi.org/10.2307/3280287>.

LOARCA-PIÑA, G. et al. Inhibitory effects of ellagic acid on the direct-acting mutagenicity of aflatoxin B1 in the *Salmonella* microsuspension assay. **Mutation Research/fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, [s.l.], v. 398, n. 1-2, p.183-187, fev. 1998. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0027-5107\(97\)00245-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0027-5107(97)00245-5).

MARQUES, M. S. **Contribuição ao estudo químico do gênero *Aspidosperma*: *Aspidosperma ramiflorum* Muell.** 1988. Dissertação de mestrado em Química orgânica- Departamento de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

MARQUES, M. M. et al. *Plasmodium vivax* chloroquine resistance and anemia in the Western Brazilian Amazon. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s.l.], v. 58, n. 1, p.342-347, 28 out. 2013. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aac.02279-12>.

MAUÉS, M. M. et al. **A castanheira-do-brasil: avanço no conhecimento das práticas amigáveis à polinização.** Funbio. Rio de Janeiro, 2015.

MELO, L. **Implantação e acompanhamento de manejo de recursos vegetais com potencial para comercialização junto aos ribeirinhos do município de Manaquiri –AM.** Tese de Doutorado em Ciências Biológicas, área de Botânica, INPA/UFAM, Manaus, 2006.

MOGHADDAM, M. G; AHMAD, F. B. H; SAMZADEH-KERMANI, A. Biological activity of betulinic acid: a review. **Pharmacology & Pharmacy**, [s.l.], v. 03, n. 02, p.119-123, 2012. Scientific Research Publishing, Inc. <http://dx.doi.org/10.4236/pp.2012.32018>.

MONTOIA, A. et al. Antiplasmodial activity of synthetic ellipticine derivatives and an isolated analog. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [s.l.], v. 24, n. 12, p.2631-2634, jun. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.04.070>.

MORE: Mecanismo online para referências, versão 2.0. Florianópolis: UFSC Rexlab, 2013. Disponível em: <<http://www.more.ufsc.br/>>. Acesso em: 08 de agosto de 2018.

MORI, S. A; PRANCE, G. T. Taxonomy, ecology and economic botany of the Brazil nut (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl.: Lecythidaceae). **Advances in Economic Botany**, 8: 130-150, 1990.

NASCIMENTO, W. M. O; CARVALHO, J. E. U; MULLER, C. H. **Castanha-do-brasil.** Jaboticabal. FUNPE, 41p. 2010.

OLIVEIRA, D. R. et al. Ethnopharmacological evaluation of medicinal plants used against malaria by quilombola communities from Oriximiná, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 173, p.424-434, set. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2015.07.035>.

PACHECO, A; SCUSSEL V. M. **Castanha-do-Brasil: da floresta tropical ao consumidor**. Florianópolis: Editograf, 2006.

PASSEMAR, C. et al. Indole and aminoimidazole moieties appear as key structural units in antiplasmodial molecules. **Phytomedicine**, [s.l.], v. 18, n. 13, p.1118-1125, out. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2011.03.010>.

PATRÍCIA-BRASIL et al. *Plasmodium simium* causing human malaria: a zoonosis with outbreak potential in the Rio de Janeiro Brazilian Atlantic forest. **bioRxiv**, p. 122127, 2017. <http://dx.doi.org/10.1101/122127>.

PECHENIK, J. A. **Biologia dos Invertebrados**. 7. ed. Porto Alegre: AMGH, 2016.

PEREIRA, M. M. et al. Alcalóides indólicos isolados de espécies do gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae). **Química Nova**, [s.l.], v. 30, n. 4, p.970-983, ago. 2007. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422007000400037>.

PEREIRA, T. B. et al. *In vitro* and *in vivo* anti-malarial activity of limonoids isolated from the residual seed biomass from *Carapa guianensis* (andiroba) oil production. **Malaria Journal**, [s.l.], v. 13, n. 1, p.317-324, 2014. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/1475-2875-13-317>.

PINTO, A. C. et al. *Piper peltatum*: biomass and 4-nerolidylcatechol production. **Planta Medica**, [s.l.], v. 76, n. 13, p.1473-1476, 1 mar. 2010. Georg Thieme Verlag KG. <http://dx.doi.org/10.1055/s-0029-1240938>.

POHLIT, A. M. et al. Amazonian plant natural products: perspectives for discovery of new antimalarial drug leads. **Molecules**, [s.l.], v. 18, n. 8, p.9219-9240, 2 ago. 2013. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules18089219>.

POHLIT, A. M. et al. LC-ESI-MS determination of quassinoids isobrucein B and neosergeolide in *Picrolemma sprucei* stem infusions. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, [s.l.], v. 20, n. 6, p.1065-1070, 2009. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-50532009000600010>.

RAYMAN, M. P. Selenium and human health. **The Lancet**, [s.l.], v. 379, n. 9822, p.1256-1268, mar. 2012. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(11\)61452-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(11)61452-9).

RIBEIRO, J. E. L. S. et al. **Flora da Reserva Ducke: Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra firme na Amazônia Central**. Manaus: INPA-DFID, 1, 568-581. 1999.

RIECKMANN, K. H. et al. Drug sensitivity of *Plasmodium falciparum*. **The Lancet**, [s.l.], v. 311, n. 8054, p.22-23, jan. 1978. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(78\)90365-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(78)90365-3).

ROBERT, G. M. T. et al. *Aspidosperma* de Guyane: alcaloïdes des graines de *Aspidosperma oblongum*. **Journal of Natural Products**, [s.l.], v. 46, n. 5, p.708-722, set. 1983. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/np50029a019>.

ROCHA E SILVA, L. F. et al. Comparative *in vitro* and *in vivo* antimalarial activity of the indole alkaloids ellipticine, olivacine, cryptolepine and a synthetic cryptolepine analog. **Phytomedicine**, [s.l.], v. 20, n. 1, p.71-76, dez. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2012.09.008>.

ROCHA E SILVA, L. F. et al. *In vitro* and *in vivo* antimalarial activity and cytotoxicity of extracts, fractions and a substance isolated from the Amazonian plant *Tachia grandiflora* (Gentianaceae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s.l.], v. 108, n. 4, p.501-507, jun. 2013. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0074-02762013000400017>.

ROCHA E SILVA, L. F. et al. *In vivo* and *in vitro* antimalarial activity of 4-nerolidylcatechol. **Phytotherapy Research**, [s.l.], v. 25, n. 8, p.1181-1188, 8 fev. 2011. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ptr.3424>.

ROCHA E SILVA, L. F. et al. *In vivo* antimalarial activity and mechanisms of action of 4-nerolidylcatechol derivatives. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s.l.], v. 59, n. 6, p.3271-3280, 23 mar. 2015. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aac.05012-14>.

ROCHA E SILVA, L. F. et al. *In vivo* evaluation of isolated triterpenes and semi-synthetic derivatives as antimalarial agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 102, p.398-402, set. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.08.022>.

ROCHA E SILVA, L. F. **Identificação de potenciais novos antimaláricos a partir de produtos naturais de plantas amazônicas, e seus derivados: estudos *in vitro*, *in vivo* e de**

**mecanismo de ação.** 2014. 165 f. Tese (Doutorado) - Programa Multi Institucional de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2014.

SILVA, E. C. C. et al. Biological activity of neosergeolide and isobrucein B (and two semi-synthetic derivatives) isolated from the Amazonian medicinal plant *Picrolemma sprucei* (Simaroubaceae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s.l.], v. 104, n. 1, p.48-56, fev. 2009. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0074-02762009000100008>.

SILVA, J. R. Resistência do *Plasmodium falciparum* à ação da cloroquina. **O Hospital**, 60:43-58, 1961.

SMITH, N. P; MORI, S A; PRANCE, G T. Lecythidaceae in lista de espécies da flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB23424>>. Acesso em 10 de agosto de 2016.

SOH, P. N. et al. *In vitro* and *in vivo* properties of ellagic acid in malaria treatment. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s.l.], v. 53, n. 3, p.1100-1106, 17 nov. 2008. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aac.01175-08>.

SOUZA, C. I. C. C. **Avaliação da atividade antimalárica de bioprodutos da *Bertholletia excelsa* H.B.K.** 2013. 88 f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Rondônia, Núcleo de Ciências e Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente. Porto Velho, 2013.

SRIVASTAVA, S. K. et al. **Antipsychotic agents and standardized antipsychotic fractions from *Rauwolfia tetraphylla* and process of their isolation.** U.S. Patent n. 9,018,226, 28 abr. 2015.

STONER, G. D; MUKHTAR, H. Polyphenols as cancer chemopreventive agents. **Journal of Cellular Biochemistry**, [s.l.], v. 59, n. 22, p.169-180, 1995. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jcb.240590822>.

STURM, N. et al. Compounds structurally related to ellagic acid show improved antiplasmodial activity. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s.l.], v. 53, n. 2, p.622-630, 17 nov. 2008. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aac.00544-08>.

SUFFNESS, M; PEZZUTO, J.M. Assay related to cancer drug discovery. In: Hostettman K.(ed.) **Methods in plant biochemistry: assay for bioactivity**. London: Academic Press; 1990, p. 71-133.

TA, T. H. et al. First case of a naturally acquired human infection with *Plasmodium cynomolgi*. **Malaria Journal**, [s.l.], v. 13, n. 1, p.68-74, 2014. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/1475-2875-13-68>.

TADEI, W. P; THATCHER, B. D. Malaria vectors in the Brazilian Amazon: *Anopheles* of the subgenus *Nyssorhynchus*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, [s.l.], v. 42, n. 2, p.87-94, abr. 2000. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0036-46652000000200005>.

TOMCHINSKY, B. **Etnobotânica de plantas antimaláricas em Barcelos, Amazonas**. 2014. 189 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2014.

TONINI, H; ARCO-VERDE, M. F. **O crescimento da castanheira-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* Bonpl.) em Roraima**. Boa Vista: Embrapa Roraima (Embrapa Roraima. Comunicado Técnico, 5) 6p. 2004.

TRAGER, W; JENSEN, J. Human malaria parasites in continuous culture. **Science**, [s.l.], v. 193, n. 4254, p.673-675, 20 ago. 1976. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.781840>.

VALE, N.; MOREIRA, R.; GOMES, P. Quimioterapia da malária um século no desenvolvimento de antimaláricos. **Química Nova**, v. 99, p. 57-69, 2005.

WHO. World Health Organization. **World malaria report 2010**. Geneva: 2010. 238 p. Disponível em: [http://www.who.int/malaria/world\\_malaria\\_report\\_2010/worldmalariareport2010.pdf](http://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2010/worldmalariareport2010.pdf)<

WHO. World Health Organization. **World malaria report 2013**. Disponível em: [http://www.who.int/malaria/world\\_malaria\\_report\\_2013/en/index.html](http://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2013/en/index.html)>.

WHO. World Health Organization. **World malaria report 2015**. Geneva: 2015. 280 p. Disponível em: <http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2015/en/>>.

WHO. World Health Organization. **World malaria report 2016**. Geneva: 2016. 186 p.  
Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Disponível em:  
<<http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/252038/9789241511711-eng.pdf;jsessionid=8766934EAD22177E1CBB90540E4941CB?sequence=1>>.

WHO. World Health Organization. **World malaria report 2017**. Geneva: 2017. 196 p.  
Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Disponível em:  
<<http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/259492/9789241565523-eng.pdf?sequence=1>>.

WHO. World Health Organization. **World malaria report 2018**. Geneva: 2018. 210 p.  
Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Disponível em:  
<<https://www.who.int/publications/i/item/9789241565653> >.

YANG, J. Brazil nuts and associated health benefits: A review. **Lwt - Food Science and Technology**, [s.l.], v. 42, n. 10, p.1573-1580, dez. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2009.05.019>.

YU, J. et al. Antitumor activities of *Rauwolfia vomitoria* extract and potentiation of carboplatin effects against ovarian cancer. **Current Therapeutic Research**, [s.l.], v. 75, p.8-14, dez. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.curtheres.2013.04.001>.