

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA NÚCLEO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO REGIONAL E MEIO AMBIENTE

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMALÁRICA DE BIOPRODUTOS DA Bertholletia excelsa H.B.K.

CAROLINE IOLANDA CORSINO DO CARMO SOUSA

Porto Velho (RO) 2013



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA NÚCLEO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO REGIONAL E MEIO AMBIENTE

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMALÁRICA DE BIOPRODUTOS DA Bertholletia excelsa H.B.K.

CAROLINE IOLANDA CORSINO DO CARMO SOUSA

Orientadora: Profa Dr. Mariangela Soares de Azevedo

Dissertação de Mestrado apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente, Área de Concentração em Ambiente, Saúde e Sustentabilidade, para obtenção do Título de Mestre em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente.

Área específica: Química de Produtos Naturais.

Porto Velho (RO)

2013

CAROLINE IOLANDA CORSINO DO CARMO SOUSA

"AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMALÁRICA DE BIOPRODUTOS DA Bertolletia excelsa H.B.K."

Comissão Examinadora

Dra. Marjangela Soares de Azevedo
Orientadora
Fundação Universidade Federal de Rondônia

Dra. Ana Karina Dias Salman Membro

Fundação Universidade Federal de Rondônia/Embrapa Rondônia

Dra. Hilda Paes Gonçalves Membro Fundação Universidade Federal de Rondônia

Dr. Wanderley Rodrigues Bastos Suplente Fundação Universidade Federal de Rondônia

Porto Velho, 17 de Dezembro de 2013.

Resultado: Survada

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo, agradecer pela força, persistência e por acreditar em nosso trabalho, colocando em nossos caminhos todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização e finalização deste trabalho.

À minha orientadora Mariangela, que desde o início, mostrou-me a quão abençoada fui ao escolhê-la para minha orientação. Sou muito grata por todos os ensinamentos, pela grande oportunidade de trabalhar ao seu lado, pelo respeito, pela amizade e carinho com que me orientastes. Tenho o maior prazer de dizer que fui muito bem orientada.

À Dra. Hilda que depositou credibilidade a este trabalho e dessa forma, possibilitou sua finalização com a certeza de sempre procurar as pessoas certas para te ajudar a melhorar.

À prof^a Dra. Ana Karina pelas suas contribuições científicas.

À Delvânia que me ajudou com a estatística e que contribuiu imensamente com nosso trabalho. Obrigada por mostrar-me o mundo dos números e gráficos e por mostrar que o que sonhamos pode ser muito pequeno diante da grandeza de nossa capacidade.

Ao meu pai, meu cerne, José Aparecido, que passou todos os seus genes de dedicação, persistência, amor ao estudo e a sempre buscar mais e mais. Obrigada pelo apoio que foi fundamental no meu trabalho, na minha vida. Meu amor maior.

À minha família Corsino do Carmo Sousa, por momentos de intenso amor e carinho, em especial minha Mãezinha, Tia Indiara e meu avó Silvério, que sempre participaram dos pequenos passos dados por uma pesquisadora em busca de seu crescimento.

À minha família do coração, que apesar de seguirmos, hoje, outros caminhos, participaram e sempre participarão da minha jornada. Seu Moisés Mendes que foi o ponto inicial desse trabalho e a minha grande companheira Rita de Cássia e a Clôzinha que me oportunizaram momentos de grande crescimento pessoal aos seus lados.

Ao Prof^o Dr. Valter Aneto, da Universidade Federal de Natal que nos deu a oportunidade de realizar os testes em seu laboratório - LABMAT, e que deu abertura para uma grande parceria. Sou muito grata por acreditar neste trabalho, principalmente por acreditar nos trabalhos científicos de pessoas que estão iniciando sua jornada.

Aos doutorandos Cláudio Bruno e Valeska, e a Joelma, Tenille e Juliete do LABMAT, que me ajudaram na realização dos testes que foram imprescindíveis para este trabalho.

Aos meus companheiros de laboratório Rafaela, Carla, Chico e Valéria. Obrigada por me ajudarem nas extrações, e principalmente pelos grandes momentos de crescimento espiritual.

Ao Esquerdo, que de todas as formas, sempre contribuiu para a realização de todos os trabalhos por mim realizados.

À Prof^a Dra. Patrícia Soares que cedeu o laboratório de Quimioterapia da Malária para os testes preliminares.

Às minhas orientadoras do Classe A, Cínthia e Carla, que desde o início souberam da minha jornada e me apoiaram incondicionalmente. Meu eterno obrigada à vocês.

À minha prima Suelen Cristina pela paciência, pela atenção, pelas chamadas que contribuíram na minha formação, mas principalmente pelas traduções de todas as madrugadas.

Aos meus mestres e professores Ari Ott e Wanderley Bastos por incentivar e abrir nossas mentes para entendermos o quanto somos e o quanto podemos ser muito mais daquilo que pensamos ser.

Ao meu amigo e companheiro de mestrado Ricardo da Silva Rodrigues, por ajudar e fazer desse mestrado uma fase de alegrias e edificações pessoais. Sou grata pelas longas conversas e discussões dos nossos trabalhos, por sempre acreditar em mim, por estar sempre disponível em ajudar-me, por mostrar-me o quanto eu sempre posso ir além do meu próprio horizonte.

Às minhas grandes amigas e companheiras de jornada, Jussara e Daiana. Meu crescimento pessoal foi imenso ao lado de vocês.

Aos meus amigos "papa-chibés" Lúber Kátia e Luís, por longos momentos de alegrias e intensos Chiiiiiiados!

Ao meu companheiro Lucas pelo apoio incondicional e por me fazer sentir a paz do verdadeiro amor.

E por fim, não menos valiosa, meu obrigada à minha mãe. Ela que completou 50 anos de exemplo de vida, mostrou-me o quanto a capacidade de um ser humano em amar, em se doar, em batalhar, pode ser infinita e incondicional. Nenhuma palavra, nem as mais sábias, serão capazes de descrever o quanto a amo e o quanto sou grata por ser a mulher que sou hoje.

RESUMO

A malária é uma doença endêmica típica de países subdesenvolvidos. A falta de interesse na busca de novos antimaláricos pelos países desenvolvidos, e principalmente a resistência às drogas antimaláricas devido a plasticidade genômica do parasito, têm se tornado um entrave no controle da doença. Visto que os dois compostos mais conhecidos contra a malária foram isolados de plantas, quinina e artemisinina, e que a partir desses vários outros foram sintetizados, a necessidade de estudos com plantas medicinais na busca de compostos bioativos contra a malária. Uma das plantas utilizadas na medicina popular contra a malária é a Bertholletia excelsa, também conhecida como castanha-do-Brasil. Após a coleta das partes selecionadas para o trabalho (casca e ouriço), as partes foram secas, trituradas, submersas em etanol PA por tempo determinado, e evaporadas em rotavapor para obtenção de extratos brutos. Para a identificação de princípios ativos, foi realizado o fracionamento por coluna filtrante com solventes de polaridade crescente (Éter de petróleo, CHCL₃, EtOAc, Acetona) e a identificação dos principais compostos com os testes de classe de substância. Os extratos e frações foram testadas enquanto sua viabilidade celular com células de macrófago – linhagem Raw- e com cepas do o *Plasmodium falciparum* – linhagem 3D7 (in vitro) e *Plasmodium* berguei (in vivo). Os estudos fitoquímicos sobre os constituintes químicos da planta indicaram a presença de terpenos, taninos, fenóis, quinonas, e uma presença mais expressiva de alcaloides. Nos ensaios in vitro com os compostos da casca, apenas as frações éter de petróleo e CHCL₃ não apresentaram resultados significativos. O extrato etanólico, a fração EtOAc e a fração acetona demonstraram uma bioatividade significativa de 83% (diluição de 100 µg.mL⁻ ¹) e CI_{50} = 6 µg.mL⁻¹ 73% (50 µg.mL⁻¹) e CI_{50} =0,1 µg.mL⁻¹ e 79% (100 µg.mL⁻¹) e CI_{50} =15 μg.mL⁻¹, respectivamente. Em relação aos compostos do ouriço, os resultados que apresentaram melhores biotividade foram o extrato etanólico, fração EtOAc e acetona com CI₅₀= 77, 63 e 10 μg.mL⁻¹, respectivamente. Nos ensaios de viabilidade celular os compostos não demonstraram toxidade significativa, com viabilidade, para os compostos da casca, de 91, 97 e 73%, na diluição de 100 μg.mL⁻¹ respectivamente. Os compostos do ouriço, extrato etanólico, frações EtOAc e acetona, apresentaram viabilidade de 91, 89 e 84% na diluição de 1,5 μg.mL⁻¹. Os resultados *in vivo* demonstraram que na dose de 250 mg/kg/dia os compostos da casca não tiveram resultados significativos no 5º dia. No entanto, no 7º dia os composto extrato etanólico e acetona mostraram bioatividade de 33% e 32,5%, respectivamente. Na dose de 500 mg/kg/dia, os compostos demonstraram um resultado significativo no 7º dia, com redução da parasitemia de 99,3 e 100%, respectivamente. Os resultados evidenciam que a B. excelsa, utilizada pela população como uma planta medicinal antimalárica, demonstrou atividade significativa contra a malária, nas formas de P. falciparum e P. berguei, e não demonstrou toxidade significativa. Este trabalho evidencia uma planta com uma promissora fonte de estudos, apresentando uma droga antimalárico em potencial.

Palavras-chaves: Plantas medicinais, atividade antimalárica, Bertholletia excelsa.

ABSTRACT

Malaria is a typical endemic disease of underdeveloped countries. The lack of interest in search for new antimalarials by developed countries, and especially the antimalarial drug resistance have become an obstacle in controlling of the disease, this is due of the parasite genomic plasticity popular compounds against malaria, quinine The two most and artemisinin were isolated from medicinal plants. From these biocompounds other bioactive compounds against malaria were synthesized. The Bertholletia excelsa. opularly known as Brazil-nut has been used in popular medicine as antimalarial. Thus, this study aims to evaluate the *in vitro* and *in vivo* activity of the parts (bark and hedgehog) of the plant against *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium berghei*. The parts of the plant collected were dried, crushed and an ethanol extract was prepared. The ethanolic extract was fractionated with gradient polarity solvents (petroleum ether, CHCl₃, EtOAc, acetone). The extract and fractions were subjected to evaluation of chemical prospecting to define classes of substances, where flavonoids, phenols and tannins were more significant. The extracts and fractions were tested about the cell viability with macrophage lineage Raw cells, and strains of the in vitro 3D7 P. falciparum and in vivo P. berguei. In vitro assays with extracts and fractions of the bark, only petroleum ether and CHCl₃ fractions did not show The ethanol extract, EtOAc and acetone fractions significant result. showed significant bioactivity of 83% (dilution of 100 μg.mL⁻¹), IC₅₀=6 μg.mL⁻¹, 73% (50μg.mL⁻¹ ¹), $IC_{50}=0.1 \mu g.m L^{-1}$ and 79% (100 $\mu g.m L^{-1}$), $IC_{50}=15 \mu g.m L^{-1}$, respectively. In relation to the hedgehog, the best bioactivity were ethanol extract, EtOAc and acetone fraction, with $IC_{50}=77$, 63 and 10 µg.mL⁻¹, respectively. In cell viability assays the extracts and fractions did not show significant toxicity, with viability for the bark compounds, 91, 97 and 73% at a 100 μg.mL⁻¹, respectively. The ethanol extract and fractions EtOAc and acetone showed viability of 91, 89 and 84% at a dilution of 1.5 µg.mL⁻¹. In vivo results showed that in dose of 250mg/kg/day the biocompounds of the bark had not show significant results on the 5th day. However on the 7th day the ethanol extract and acetone fraction showed bioactivity of 33% and 32.5%, respectively. At a dose of 500 mg/kg/day, the biocompounds showed a significant result on 7th day, with a reduction of parasitaemia of 99.3 and 100%, respectively. The results show that the B. excelsa, used by the population as antimalarial, demonstrated significant activity against the disease and did not show significant toxicity. This result may show that B. excelsa may have potential as an antimalarial activity.

Key words: Medicine plants, antimalarial activity, *Bertholletia excelsa*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Distribuição de pobreza e de malária no mundo.
Figura 2 Mapa do Brasil, destacando as áreas de riscos para malária pelos diferentes níveis de
incidência parasitária anual
Figura 3 Casos de malária notificados na Região Amazônica entre 2000 a 2011
Figura 4 Lâminas mostrando a obstrução capilar por eritrócitos parasitados (aumento
x1.000), (A) corte do cérebro e (B) miocárdio.
Figura 5 Ciclo de vida do <i>Plasmodium falciparum</i> .
Figura 6 Estruturas das moléculas das principais drogas antimaláricas
Figura 7 Estrutura dos derivados da Artemisinina.
Figura 8 Local de ação das drogas antimaláricas no ciclo de vida do parasita32
Figura 9 Indivíduo da castanha-do-Brasil (<i>B. excelsa</i>).
Figura 10 Foto satélite do local de coleta das partes da planta da Bertholletia excelsa (8'13 12
49" S 64'01 02 51" O)
Figura 11 Evaporação do solvente em evaporador rotatório
Figura 12 Esquema geral da metodologia dos ensaios fitoquímicos e biológicos43
Figura 13 Atividade in vitro dos compostos da casca frente à cepa 3D7 - P. falciparum
Diferenças significativas (p<0,05) em relação ao controle são indicadas pelo símbolo (**)5
Figura 14 Atividade in vitro dos compostos do ouriço frente à cepa 3D7 - P. falciparum
Diferenças significativas (p<0,05) em relação ao controle são indicados pelo símbolo (**)52
Figura 15: Resultados dos ensaios de citotoxicidade in vitro do Extrato etanólico da casca en
macrófagos de camundongos pela metodologia MTT. O gráfico mostra a viabilidade celula
em diferentes concentrações. Os valores apresentam média e \pm desvio padrão do percentual d
concentração citotóxica. Diferenças estatisticamente significativas (p<0,05) em relação ao
controle são indicados pelo símbolo (*).
Figura 16: Resultados dos ensaios de citotoxicidade in vitro da fração EtOAc da casca en
macrófagos de camundongos pela metodologia MTT. O gráfico mostra a viabilidade celula
em diferentes concentrações. Os valores apresentam média e \pm desvio padrão do percentual d
concentração citotóxica. Diferenças estatisticamente significativas (p<0,05) em relação ao
controle são indicados pelo símbolo (*).
Figura 17: Resultados dos ensaios de citotoxicidade in vitro da Fração Acetona da casca en
macrófagos de camundongos pela metodologia MTT. O gráfico mostra a viabilidade celula
em diferentes concentrações. Os valores apresentam média e ± desvio padrão do percentual d

concentração citotóxica. Diferenças estatisticamente significativas (p<0,05) em relação ao
controle são indica concentraçdos pelo símbolo (*)
Figura 18: Resultados dos ensaios de citotoxicidade in vitro do Extrato etanólico do ouriço
em macrófagos de camundongos pela metodologia MTT. O gráfico mostra a viabilidade
celular em diferentes concentrações. Os valores apresentam média e \pm desvio padrão do
percentual de concentração citotóxica. Diferenças estatisticamente significativas (p<0,05) em
relação ao controle são indicados pelo símbolo (*)
Figura 19: Resultados dos ensaios de citotoxicidade in vitro da Fração EtOAc do ouriço em
macrófagos de camundongos pela metodologia MTT. O gráfico mostra a viabilidade celular
em diferentes concentrações. Os valores apresentam média e \pm desvio padrão do percentual de
concentração citotóxica. Diferenças estatisticamente significativas (p<0,05) em relação ao
controle são indicados pelo símbolo (*).
Figura 20 Resultados dos ensaios de citotoxicidade in vitro da Fração Acetona do ouriço em
macrófagos de camundongos pela metodologia MTT. O gráfico mostra a viabilidade celular
em diferentes concentrações. Os valores apresentam média e \pm desvio padrão do percentual de
concentração citotóxica. Diferenças estatisticamente significativas (p < 0.05) em relação ao
controle são indicadas pelo símbolo (***).
Figura 21 Gráfico de redução de parasitemia dos compostos, EtOAc, extrato etanólico da
casca e acetona na dose de 250 mg/kg/dia administrada via oral (gavage) após cálculo de erro
padrão dos 2 experimentos
Figura 22 Redução da parasitemia da fração EtOAc e do extrato etanólico da casca na dose
de 500 mg/kg/dia administrada via oral (gavage) após cálculo de erro padrão dos 2
experimentos63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Resistência aos antimaláricos: Ano de introdução e Primeiro relato de resistência
Adaptado de Wongsrichanalai et al, 2002.
Tabela 2 Massa dos extratos provenientes da extração alcoólica e aquosa. 42
Tabela 3 Massa obtida após o fracionamento por coluna cromatográfica
Tabela 4 Principais metabólitos secundários encontrados nos extratos e frações <i>B. excelsa.</i> .49
Tabela 5 Supressão da parasitemia em animais infectados com P. berghei e redução geral
com erro padrão calculado após a realização dos testes (n=2). Tratamento oral (250 e 500
mg/kg/dia) com extrato etanólico e frações EtOAc e Acetona da casca
Tabela 6 Média de sobrevida ± desvio padrão após a realização dos experimentos64

APÊNDICE

Apêndice 1 Atividade in vitro da cloroquina frente à cepa 3D7 - P. falciparum
Apêndice 2 Resultado dos ensaios in vitro do Extrato etanólico da casca da B. excelsa frente à
cepa 3D7 - Plasmodium falciparum. A tabela mostra a viabilidade dos compostos em
diferentes concentrações. Os valores apresentam média e \pm desvio padrão do percentual de
inibição de crescimento do parasito. Diferenças estatisticamente significativas (p< 0,05) em
relação ao controle são indicados pelo símbolo (*)
Apêndice 3 Resultado dos ensaios in vitro da fração Éter de Petróleo da casca da B. excelsa
frente à cepa 3D7 – <i>Plasmodium falciparum</i> . A tabela mostra a viabilidade dos compostos em
diferentes concentrações. Os valores apresentam média e \pm desvio padrão do percentual de
inibição de crescimento do parasito. Diferenças estatisticamente significativas (p< 0,05) em
relação ao controle são indicados pelo símbolo (*)
Apêndice 4 Resultado dos ensaios in vitro da fração CHCL3 da casca da B. excelsa frente à
cepa 3D7 - Plasmodium falciparum. A tabela mostra a viabilidade dos compostos em
diferentes concentrações. Os valores apresentam média e \pm desvio padrão do percentual de
inibição de crescimento do parasito. Diferenças estatisticamente significativas (p< 0,05) em
relação ao controle são indicados pelo símbolo (*)
Apêndice 5 Resultado dos ensaios in vitro da fração EtOAc da casca da B. excelsa frente à
cepa 3D7 - Plasmodium falciparum. A tabela mostra a viabilidade dos compostos em
diferentes concentrações. Os valores apresentam média e \pm desvio padrão do percentual de
inibição de crescimento do parasito. Diferenças estatisticamente significativas (p< 0,05) em
relação ao controle são indicados pelo símbolo (*)
Apêndice 6 Resultado dos ensaios in vitro da fração Acetona da casca da B. excelsa frente à
cepa 3D7 - Plasmodium falciparum. A tabela mostra a viabilidade dos compostos em
diferentes concentrações. Os valores apresentam média e \pm desvio padrão do percentual de
inibição de crescimento do parasito. Diferenças estatisticamente significativas (p< 0,05) em
relação ao controle são indicados pelo símbolo (*)
Apêndice 7 Resultado dos ensaios in vitro do Extrato etanólico do ouriço da B. excelsa frente
à cepa 3D7 - Plasmodium falciparum. A tabela mostra a viabilidade dos compostos em
diferentes concentrações. Os valores apresentam média e \pm desvio padrão do percentual de
inibição de crescimento do parasito. Diferenças estatisticamente significativas (p< 0,05) em
relação ao controle são indicados pelo símbolo (*)

Apêndice 8 Resultado dos ensaios <i>in vitro</i> da fração CHCL ₃ do ouriço da <i>B. excelsa</i> frente à
cepa 3D7 - Plasmodium falciparum. A tabela mostra a viabilidade dos compostos em
diferentes concentrações. Os valores apresentam média e ± desvio padrão do percentual de
inibição de crescimento do parasito. Diferenças estatisticamente significativas (p< 0,05) em
relação ao controle são indicados pelo símbolo (*)
Apêndice 9 Resultado dos ensaios in vitro da fração EtOAc do ouriço da B. excelsa frente à
cepa 3D7 - Plasmodium falciparum. A tabela mostra a viabilidade dos compostos em
diferentes concentrações. Os valores apresentam média e ± desvio padrão do percentual de
inibição de crescimento do parasito. Diferenças estatisticamente significativas (p< 0,05) em
relação ao controle são indicados pelo símbolo (*)
Apêndice 10 Resultado dos ensaios in vitro da fração Acetona do ouriço da B. excelsa frente
à cepa 3D7 - Plasmodium falciparum. A tabela mostra a viabilidade dos compostos em
diferentes concentrações. Os valores apresentam média e ± desvio padrão do percentual de
inibição de crescimento do parasito. Diferenças estatisticamente significativas (p < 0.05) em
relação ao controle são indicados pelo símbolo (*)
Apêndice 11 Taxa de morte celular (macrófagos) após incubação em diferentes concentrações
do Extrato etanólico da casca. Diferenças estatisticamente significativas (p $<$ 0,05) em relação
ao controle são indicados pelo símbolo (*).
Apêndice 12 Taxa de morte celular (macrófagos) após incubação em diferentes concentrações
da Fração EtOAc da casca. Diferenças estatisticamente significativas (p $<$ 0,05) em relação ao
controle são indicados pelo símbolo (*)
Apêndice 13 Taxa de morte celular (macrófagos) após incubação em diferentes concentrações
da Fração Acetona da casca. Diferenças estatisticamente significativas (p< 0,05) em relação
ao controle são indicados pelo símbolo (*).
Apêndice 14 Taxa de morte celular (macrófagos) após incubação em diferentes concentrações
do Extrato etanólico do ouriço. Diferenças estatisticamente significativas (p< 0,05) em
relação ao controle são indicados pelo símbolo (*)
Apêndice 15 Taxa de morte celular (macrófagos) após incubação em diferentes concentrações
da Fração EtOAc do ouriço. Diferenças estatisticamente significativas (p< 0,05) em relação
ao controle são indicados pelo símbolo (*).
Apêndice 16 Taxa de morte celular (macrófagos) após incubação em diferentes concentrações
da Fração Acetona do ouriço. Diferenças extremamente significativas (p< 0,05) em relação ao
controle são indicados pelo símbolo (***)

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	
1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
1.1 MALÁRIA	18
1.1.1 Histórico da Malária	18
1.1.2 Malária: Doença Negligenciada	19
1.1.3 Situação da Malária no Brasil	20
1.1.4 Malária e o Desenvolvimento Regional na Amazônia	23
1.1.5 Agente Etiológico e Ciclo de Vida nos Seres Humanos	26
1.1.6 Quimioterapia Antimalárica	29
1.2 PLANTAS MEDICINAIS E BUSCA POR NOVAS DROGAS	34
1.3 CASTANHA-DO-BRASIL - Bertholletia excelsa H.B.K	36
1.3.1 Características Gerais e Botânicas	36
1.3.2 Indicações Terapêuticas e Principais Constituintes Químicos	37
2. OBJETIVOS	39
2.1 OBJETIVO GERAL	39
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
3. MATERIAL E MÉTODO	
3.1 COLETA E IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA	40
3.2 OBTENÇÃO DE EXTRATOS E FRAÇÕES	41
3.3 BIOPROSPECÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS	42
3.3.1 Esteroides e Terpenos	43
3.3.2 Flavonóides	43
3.3.3 Quinonas	43
3.3.4 Fenóis e taninos	43
3.3.5 Alcalóides	44
3.4 CULTIVO DO PARASITO	44
3.4.1 Manutenção do <i>Plasmodium falciparum</i>	44
3.4.2 Manutenção do <i>Plasmodium berghei</i>	45
3.5 TESTES ANTIMALÁRICOS in vitro – Plasmodium falciparum	45
3.6 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE in vitro	46
3.7 ANIMAIS E COMITÊ	46

3.8 ENSAIO ANTIMALÁRICO in vivo — Plasmodium berghei	47
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4.1 BIOPROSPECÇÃO DOS COMPOSTOS DA <i>B. excelsa</i>	49
4.2 ATIVIDADE ANTIMALÁRICA in vitro	50
4.3 ATIVIDADE CITOTÓXICA	54
4.3.1 Compostos da Casca	54
4.3.2 Compostos do Ouriço	56
4.4 ATIVIDADE in vivo	61
5 CONCLUSÃO	66
PESPECTIVAS FUTURAS	67
REFERÊNCIAS	68
APÊNDICE	81

INTRODUÇÃO

A malária ou paludismo é uma doença parasitária que tem como sintomas clínicos mais frequente a febre, acesso malárico (suor, calafrio e suor), cefaleia e anemia. Se não tratada de forma adequada pode levar aos casos mais graves da doença, como a obstrução dos vasos sanguíneos e comprometimento visceral, situações que podem levar a morte do indivíduo (VERONEZI, 1983).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (2013), a malária é uma doença endêmica que está restrita a países subdesenvolvidos. Anualmente são registrados cerca de 290 milhões de novos casos e, aproximadamente, 900 mil mortes. Devido a esses números significativos, a malária é considerada uma das doenças mais importantes do mundo.

Na ausência de uma vacina efetiva contra a malária, a farmacoterapia é, atualmente, a única arma capaz de controlar e combater essa enfermidade. Contudo, a resistência aos antimaláricos usuais representa um dos maiores obstáculos para o êxito no combate e controle da malária (COUTO, et al, 1993).

Portanto, a urgente necessidade no desenvolvimento de novos fármacos na estratégia de controle do parasito.

Uma fonte promissora na busca e obtenção de novos fármacos são as plantas medicinais. Muitos compostos derivados desses produtos têm sido comprovados cientificamente e utilizadas no combate à muitas enfermidades. Alia-se a isso, o fato que os dois principais antimaláricos, quinina e artemisinina, e que deram origem à outros antimaláricos, foram os primeiros isolados de produtos naturais, *Cinchona officinalis* e *Artemisina annua*, respectivamente (KLAYMAN, 1985; CECHINEL e YUNES, 1998; GEN e LIN).

Estudos comprovam que a probabilidade de encontrar compostos bioativos em plantas medicinais orientadas pela população é maior que àquelas escolhidas pelo acaso (CHECHINEL e YUNES, 1998; ELISABETSKY e SOUZA, 2003).

Em pesquisa preliminar foi realizado um levantamento, com a população ribeirinha de Porto Velho, para identificar quais plantas medicinais seriam utilizadas contra a malária, em que foi observado que a população utiliza o chá da casca da castanheira-do-Brasil, *Bertholletia excelsa* no combate a malária (SOUSA, 2010). Através desse levantamento foi possível justificar o presente trabalho, onde avaliou-se a citotoxicidade da planta frente às células de defesa (macrófagos), a atividade *in vitro* frente à cepa do *Plasmodium falciparum* e

a atividade *in vivo* frente à cepa *Plasmodium berghei*. Esses ensaios permitem comprovar a veracidade das informações obtidas pela população ribeirinha em relação a sua atividade antimalárica.

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 MALÁRIA

A malária é um grave problema de saúde pública no mundo por ter abrangência em mais de 109 países e territórios, ocorrendo em quase 50% da população atingida. Os países mais afetados são os africanos, situados ao Sul do deserto de Saara, os do Sudeste Asiáticos e os da América Latina, particularmente os situados na região da Bacia amazônica. Somente em 2010, 90% dos casos de malária foram registrados na África (OMS, 2013).

Devido à sua elevada incidência nas regiões intertropicais e de sua potencial gravidade na evolução da doença, a malária reveste-se de importância epidemiológica. Causa consideráveis perdas sociais e econômicas na população sob risco, principalmente aquela que vive em condições precárias de habitação e saneamento (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

Nos países endêmicos a estimativa é de 300 milhões de novos casos e um milhão de mortes por ano, atingindo principalmente e crianças menores de 5 anos e grávidas africanas. Somente em 2010, aproximadamente 600.000 crianças africanas morreram em decorrência da malária, ou seja, a cada 1 minuto, uma criança africana morre por essa causa (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008; OMS, 2013).

Em decorrência de seus altos índices de morbidade e prevalência, a malária é considerada uma das doenças mais importantes do mundo (MELLO, 1985).

1.1.1 Histórico da Malária

A malária ou paludismo, também conhecido por impaludismo, febre palustre, febre intermitente ou, em suas formas específicas, febre terçã benigna, febre terçã maligna e febre quartã, recebe no Brasil nomes populares como maleita, sezão, tremedeira, batedeira ou, simplesmente, febre (REY, 2001).

Devido as características clínicas dessa doença, foi possível reconhecer a sua presença em escritos chineses de 3000 aC., nas tábuas cuneiformes mesopotâmicas (2000 a.C.) e em escrituras Vedas na Índia (1800 aC). O que mostra que a malária acompanha a humanidade desde as mais antigas civilizações (CAMARGO, 1995).

Apesar das descrições feitas pelos povos antigos, durante muito tempo essa doença ficou envolta por um clima de misticismo por desconhecerem sua transmissão. Na história médica ocidental, referências aos sintomas da malária vêm desde Hipócrates, que a descreveu

em detalhes e afastou todo e qualquer tratamento que não fosse aquele que estivesse à luz da ciência. Considerado o pai da ciência, ele foi o primeiro a descrever o processo as consequências dessa contaminação na população (LUNA Filho, 2005).

Depois de Hipócrates, narrativas se sucedem na história romana e por toda a Idade Média. Um fato comum em todas as crônicas é que a ocorrência de malária está associada a regiões pantanosas, várzeas e alagadiços (CAMARGO, 1995). Por isso, o termo malária surgiu a partir dessa relação entre a doença e os pântanos, que passou a ser descrita como *ária cattiva* ou *mal'aria* (ar ruim) pelos italianos do século XIV e que só entrou para a língua inglesa em torno de 200 anos depois. Outro termo muito utilizado para malária é o paludismo que foi criado pelos franceses, cujo significado era pântano (FRANÇA, 2008).

1.1.2 Malária: Doença Negligenciada

A malária é uma doença que está restrita à países subdesenvolvidos. Ela já desapareceu dos países Europeus e Norte americano, onde se manifestou até metade do século XX. Na década de 90 foram registrados cerca de 400 casos anuais de malária no Canadá e aproximadamente 900 casos anuais nos Estados Unidos, sendo que a maioria foi importada: apenas alguns casos foram de origem do próprio país resultantes de transfusões sanguíneas (CAMARGO, 2003).

Essa erradicação da doença nos países desenvolvidos foi devido ao aperfeiçoamento tecnológico e aos avanços científicos nas áreas da saúde, após a Segunda Guerra Mundial com a Revolução Industrial. Esses avanços tecnológicos possibilitaram a criação de novos instrumentos de defesa no combate à diversos tipos de doenças, como a malária (HARRISON, 2005).

Os baixos índices nos países desenvolvidos diminuiu o interesse na busca por novos instrumentos para o controle da doença, na qual, de 1223 novas drogas desenvolvidas (entre as décadas de 70 e 90) apenas três eram antimaláricos. A malária, portanto, passa a integrar as doenças negligenciadas (GREENWOOD e MUTABINGWA, 2002).

Fato esse, que só confirma a ligação entre a doença e a pobreza (figura 1). Sendo considerada como uma das causas e consequências da péssima situação econômica dos diversos países subdesenvolvidos e os que estão em desenvolvimento, à malária tem sido inferida como umas das principais barreiras no crescimento econômico destas nações (RBM, 1999 apud FRATUS, 2008). Somente na África, os custos diretos e indiretos do controle da doença são da ordem de US\$12 bilhões por ano (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008). Para

economias em desenvolvimento, isso significa um abismo maior entre as economias de países pobres e países ricos.





Fonte: Adaptado por FRATUS, 2008

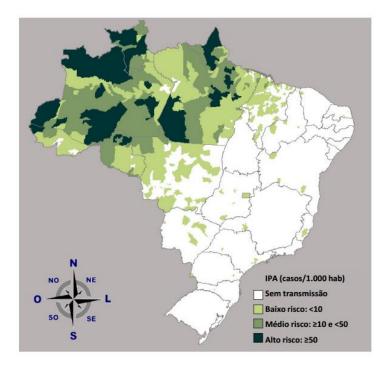
Figura 1 Distribuição de pobreza e de malária no mundo.

1.1.3 Situação da Malária no Brasil

Atualmente, o Brasil é responsável por 50,6% dos casos de malária registrados nas Américas e divide seu território em duas áreas: a região endêmica, constituídas pelos estados da Amazônia Legal: Acre, Amapá, Maranhão, Mato Grosso, Roraima, Tocantins, Amazonas, Pará e Rondônia. E a região não endêmica, constituída pelos demais estados da federação (KIRCHGATTER, 2001; BRASIL, 2006; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

A região endêmica é responsável por cerca de 99,7% dos casos de malária ocorridos no país, sendo os estados do Amazonas, Pará e Rondônia responsáveis por 88% desse total. Apesar de ser considerada focal essa doença não se transmite com igual rapidez ou intensidade. Sua dinâmica de transmissão é variável, dependendo da interação de fatores ambientais, socioculturais, econômicos e políticos (BRASIL, 2006).

No Brasil, para saber se determinada região tem alto ou baixo risco de malária, é necessária medir o grau de risco. Para isso, é preciso saber a Incidência Parasitária Anual (IPA) (figura 2), que pode ser classificada em: alto risco (IPA ≥ 50/1.000 hab.), médio risco (IPA entre 10-49/1.000 hab.) e baixo risco (IPA < 10/1.000 hab.). Na Amazônia o risco de adoecer é considerado médio (18,6) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).



Fonte: SIPEP_MALARIA E SINAN/SVS/MS-atualizado em 26.07.2012.

Figura 2 Mapa do Brasil, destacando as áreas de riscos para malária pelos diferentes níveis de incidência parasitária anual.

As epidemias de malária no Brasil iniciam-se como advento da vulcanização da borracha em 1839, tornando-a uma matéria-prima preciosa. No mesmo período e fugindo da grande seca que arrasava o nordeste, milhares de nordestinos migraram para Amazônia brasileira com perspectivas de extração do látex e de riquezas imediatas. Essa intensa migração de trabalhadores ficou conhecido como Primeiro Ciclo da Borracha, no início do século XIX e deu origem a primeira grande epidemia amazônica de malária (PINTO, 1993).

Também em função do látex, o Brasil comprometeu-se a construir a Estrada de Ferro Madeira Mamoré, para o escoamento da borracha boliviana. Durante sua construção houve a segunda epidemia amazônica de malária (PINTO, 1993).

Outra grande epidemia ocorrida no Brasil aconteceu nos estados do Ceará e do Rio Grande do Norte, na década de 30. Provavelmente trazidos ao Brasil por barcos no período da escravidão, o *Anopheles gambiae* provocou um surto de malária nesses estados, provocando cerca de 14 mil mortes (DEANE, 1986; BRASIL, 2006).

Até a década de 40, a malária atingia 70% dos municípios brasileiros, o que equivalia a 85% da superfície do Brasil. Com a criação da Campanha de Erradicação da Malária (CEM), em 1958, houve um extraordinário esforço que resultou em forte impacto na transmissão da doença, quando não na sua completa interrupção, tal como ocorreu em

extensas áreas das regiões sul, sudeste e nordeste (SILVEIRA, 2001; LADISLAU et al., 2006).

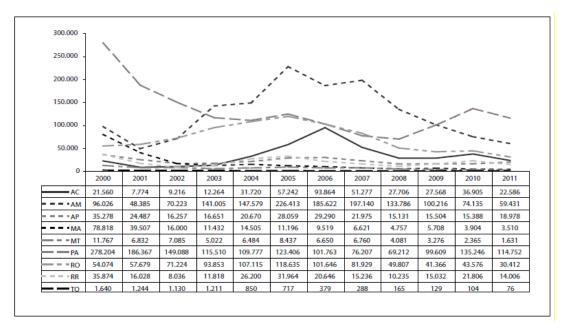
Dessa forma a Amazônia Legal passou a registrar 97,5% dos casos de malária em meados da década de 80, quando houve um grande aumento nessa região. Esse aumento deuse pelo incentivo, pelos órgãos governamentais, de uma política de promoção, integração e desenvolvimento econômico da região amazônica. Esse incentivo refere-se à construção de estradas, construção de usinas hidroelétricas, instalação de garimpos e assentamentos promovidos pelo Instituto Nacional de Reforma Agrária (INCRA) (FUNASA, 2000).

Esse deslocamento de grande contingente populacional - sem contato prévio com a malária – para áreas endêmicas aumentou enormemente o número de epidemias localidades na Amazônia, principalmente em assentamentos de colonos. Em números, a malária passa 52.469 mil casos, na década de 70, para 169.871, na década de 80, chegando a uma média de 500 mil casos anuais na década de 90 (BARATA, 1995; LADISLAU et al., 2006).

Na década de 90, todos os estados da Amazônia Legal apresentaram Índice Parasitário anual (IPA) acima de sete lâminas positivas por mil habitantes. Os estados de Rondônia e Roraima apresentaram os maiores índices, 128,3/mil e 146,5/mil habitantes, respectivamente. No estado de Rondônia, 16 dos 23 municípios tinham taxas elevadas de malária, principalmente em áreas de colonização e garimpos (MARQUES, 1992; BARATA, 1995).

Nos últimos anos, a ocupação desordenada dos espaços peri-urbanos, tem sido relatadas como um importante fator no aumento da malária nas cidades. Manaus e Porto Velho, capitais do Amazonas e Rondônia, respectivamente, vêm recebendo um fluxo intenso de pessoas, que se deslocam de outros municípios em busca de oportunidades de trabalhos ou necessidades comerciais. Assim, esses municípios concentraram 26,9% e 22,9% dos casos de malária da região endêmica nos anos de 2002 a 2005 (SVS, 2005; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008, 2013).

Com a introdução da artemisinina como fármaco de primeira escolha, observou-se uma reversão dessa tendência nos anos seguintes, 2008 (314.754 casos) e 2009 (307.689 casos), quando comparado aos anos anteriores (figura 3). De uma forma mais geral, de 2000 a 2011, houve uma redução de 56,7% dos casos de malária, o que representa um total de 348.899 mil casos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013)



Fonte: SIVEP - MALÁRIA/SVS/MS, 2013.

Figura 3 Casos de malária notificados na Região Amazônica entre 2000 a 2011.

1.1.4 Malária e o Desenvolvimento Regional na Amazônia

Na publicação "Situação epidemiológica da malária no Brasil 2005", o Secretário de Vigilância Sanitária, Jarbas Barbosa afirma:

A malária continua sendo um grave problema de Saúde Pública na Região Amazônica, devido à alta incidência e aos efeitos debilitantes para as pessoas acometidas por essa doença, com um importante potencial de influenciar o próprio desenvolvimento daquela região.

Mesmo diante de todos os avanços na medicina, a malária continua a ser um agravante no desenvolvimento regional da área acometida por esta. Sua luta perdura por mais de meio século, passando por várias estratégias de controle.

Os primeiros registros brasileiros indicam que, em 1889, os Serviços de Saúde dos Portos foram regulamentados para o combate das endemias. Em 1923, o Departamento Nacional de Saúde Pública estabeleceu medidas profiláticas e de controle da doença, dentre as quais se destacou o diagnóstico precoce, determinação de índice endêmico e o uso de medidas antilarvárias (BRASIL, 2006).

Com a violenta epidemia na década de 1930 que assolou parte do nordeste, foi criada em 1939 o Serviço de Malária do Nordeste (SMN), que em parceria com a Fundação

Rockfeller, desenvolveu um programa que erradicou o *A. gambie* do território brasileiro. Assim, em 1941, estimulado pelo êxito no combate àquele anofelino, foi criado o Serviço Nacional de Malária (SNM), que introduziu em larga escala, principalmente na área urbana, o uso do DDT no combate aos anofelinos. Sua introdução no Brasil representou uma revolução no combate à malária no país e no mundo. Utilizado de modo experimental durante a Segunda Guerra Mundial, a utilização desse inseticida de ação residual tornou-se uma prática de combate e controle da malária (NUNES Medina, 1988; BRASIL, 2006).

Em 1958 foi criado e instalado durante sete anos, a Campanha de Erradicação da Malária (CEM), que logrou grande êxito, pois se conseguiu interromper a transmissão de malária em toda a região Sul e Sudeste, em quase todo o Nordeste e parte da Região Centro-Oeste. Nessas regiões, as características das moradias, a estabilidade das populações e um maior grau de desenvolvimento socioeconômico facilitaram a efetividade do inseticida no interior das residências (BRASIL, 2006; SILVA 2008).

Preocupados com o problema crescente da malária nos países subdesenvolvidos, em 1969 na "XXII Assembleia Mundial de Saúde" foi recomendado à reclassificação das áreas endêmicas em áreas para a erradicação a curto e longo prazos (FARID, 1980). Posteriormente, passou-se a adotar uma estratégia epidemiológica segundo os níveis de transmissão, para priorizar ações de combate à doença, concentrando os reduzidos recursos disponíveis nas áreas de maior risco (BRADLEY, 1991).

Em outubro de 1992 na Conferência Ministerial sobre a Malária, realizada em Amsterdã, na Holanda, e patrocinada OMS, recomendou-se a adoção de uma nova estratégia global com base na realidade epidemiológica, social e local. Essa estratégia ficou conhecida como Controle Integrado da Malária (CIM) e incorporava medidas de controle adequadas a cada situação, ação multissetorial para redução de influência de fatores de risco de natureza socioeconômica, cultural, política e ecológica com participação ativa da população (LITSIOS, 1993; BRASIL 2006).

A principal atividade na luta contra a malária deveria ser com os seres humanos e não mais com insetos vetores, na medida em que se busca, primeiramente, prevenir os casos graves e as mortes causadas pela doença (OMS, 1993). O CIM, como uma ação conjunta do governo e da sociedade dirigida para eliminação ou redução dos riscos de morrer ou adoecer de malária, é a nova orientação da luta contra a doença, adotada pelo Brasil em consonância com as recomendações da Conferência da Amsterdã (BRASIL, 2006).

Com a promulgação da Constituição da República Federativa do Brasil, em 1988, o setor de saúde do Brasil passa por uma transformação, tanto na organização e funcionamento

dos serviços de assistência à saúde, como para o controle das doenças endêmicas. A implantação do Sistema Único de Saúde (SUS), de acordo com as diretrizes e princípios previstos nessa constituição, tem como principal norteador a descentralização para os estados e municípios das ações de promoção, proteção e recuperação da saúde, além da reformulação da política de controle de endemias, inclusive da malária (TAUIL, 2002).

A portaria nº 1.399/MS, de dezembro de 1999, regulamenta o processo de descentralização na área de vigilância epidemiológica e de controle de doenças, na qual estabelece as competências da União, estados, municípios e Distrito Federal, que definam a sistemática de financiamento e providências. No caso particular da malária, a descentralização das decisões e execuções das medidas de intervenção coincidiu com a real mudança de estratégia da luta contra a doença, por intermédio da intensificação das ações e controle da Amazônia Legal, a partir do ano de 2000 (BRASIL, 2005).

O projeto que intensificou as ações de controle e intervenção da malária, e que serviu de base para outros, foi o Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária (PIACM). Sua implantação e promoção foram no ano de 2000 pela Fundação Nacional de Saúde (FUNASA), com parceria e compromisso político das três esferas do governo. Apoiado e estruturado nos sistemas locais de saúde, capacitou-os para a coordenação e execução das ações de controle da malária, e desta forma, fortalecer o processo de descentralização (TAUIL, 2002; BRASIL, 2003; BRASIL, 2006).

O plano mostrou-se bastante efetivo no controle da malária, onde se observou uma redução significativa na sua incidência desde 1961. Registrou-se, ao final de 2001, comparado com 1999, uma diminuição de 38,9% nos números de casos de malária, redução de 41,1% no IPA; redução de 69,2% no número de internações; redução de 36,5% no número de óbitos (TAUIL, 2002; BRASIL, 2003).

Outra ação do governo, implantado desde 2001, é a Rede Amazônica de Vigilância da Resistência as Drogas Antimaláricas (Ravreda). Nesta rede participam o Brasil, Bolívia, Equador, Colômbia, Guiana, Peru, Suriname e Venezuela, e tem como objetivo principal, monitorar a resistência do plasmódio às drogas antimaláricas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

E desde 2003 em vigência, o Programa Nacional de Controle da Malária (PNCM). Este programa, que dá continuidade aos avanços proporcionados pelo PIACM e agrega sugestões das secretarias estaduais e municipais de saúde, tem como objetivo principal, reduzir a morbimortalidade por malária com estratégias de intervenção de forma integrada. A

principal destas estratégias é a realização de diagnóstico e tratamento adequado e oportuno (BARBOSA, 2003; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

As intervenções de controle têm contribuído para modificar a dinâmica de transmissão da doença na Região, alcançando resultados promissores na maioria dos municípios. Diante de todos os avanços em relação aos números de casos de malária, esta, ainda, continua sendo um grave problema de saúde pública na Região Amazônica, necessitando de muito trabalho nesta área (BRASIL, 2005).

1.1.5 Agente Etiológico e Ciclo de Vida nos Seres Humanos

O agente etiológico causador da malária pertence ao filo Apicomplexa, ordem Coccidiida, subordem Haemosporidiidea, família Plasmodiidae e ao gênero *Plasmodium*, sendo que cada uma de suas espécies determina aspectos clínicos diferentes para esta enfermidade (FERREIRA, 2006; FRATUS, 2008).

São conhecidas aproximadamente 150 espécies causadores de malária em diferentes hospedeiros vertebrados, como répteis, aves e mamíferos (primatas e roedores), possuindo formas variáveis de acordo com as fases do seu ciclo de vida (REY, 2001).

Até pouco tempo atrás, tinham-se conhecimento que apenas quatro espécies de *Plasmodium* infectavam o homem: *P. malarie* descrito por Laveran, 1881; *P. falciparum* descrito por Welch, 1897; *P. vivax* descrito por Grassi e Feletti, 1890; e *P ovale* descrito por Stephens, 1922 (TAUIL, 2002; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003).

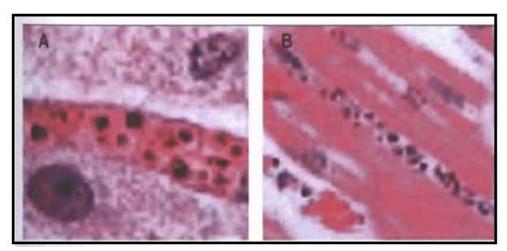
Entretanto vários trabalhos recentes demonstraram que uma nova espécie possui a capacidade de desenvolver o ciclo assexuado em humanos: "a 5ª espécie de *Plasmodium* humano". Essa espécie, conhecida como *Plasmodium knowlesi* descrita por Sinton e Mulligan em 1932, estava originalmente associada à malária em macacos e recentemente é tido como espécie parasitária no homem, especialmente em regiões asiáticas (WHITE, 2007; SCHOTTELIUS et al, 2010; OMS, 2013).

Dentre as espécies que habitualmente infectam o homem, as principais são:

- *P. falciparum*, espécie mais patogênica e prevalente do mundo, responsável pela febre terçã maligna, com acesso febril a intervalos de 36 a 48 horas. Essa espécie é a responsável pelos casos fatais da doença devido ao fato de o parasito, nas suas formas maduras, aderir aos vasos endoteliais e causar a obstrução destes, em especial no cérebro (Figura 4). Dotado de uma grande capacidade de adaptação e citoaderência, é a principal espécie presente no continente

africano, sendo responsável por 70% dos casos de malária no mundo na atualidade (REY, 2001; KRETTLI, 2008).

- *P. vivax*, agente da febre terçã benigna, com ciclos de 48 horas. Essa espécie não causa uma forma fatal da doença, mas provoca acessos febris de grande intensidade, e assim como o *P. ovale* têm estágios de vida latentes chamadas hipnozoítos que podem permanecer nesse estágio por grandes períodos (REY, 2001; ALBRECHT, 2008).
- *P. malariae*, causa a febre quartã, que se caracteriza pela ocorrência de acessos febris a cada 72 horas (REY, 2001).
- *P. ovale*, que é responsável por outra febre terçã benigna, com ciclos de 48 horas. Possui distribuição limitada ao continente africano (REY, 2001; TUTEJA, 2007; ALBRECHT, 2008).
- *P. knowlesi*: multiplica-se diariamente e é potencialmente perigoso. Amplamente distribuído na Malásia, foi encontrado 30,7% (312/1014) de positividade para essa espécie em amostras de pacientes com malária de vários locais do país (COX-Singh e SINGH, 2008).



Fonte: NEVES, 2005

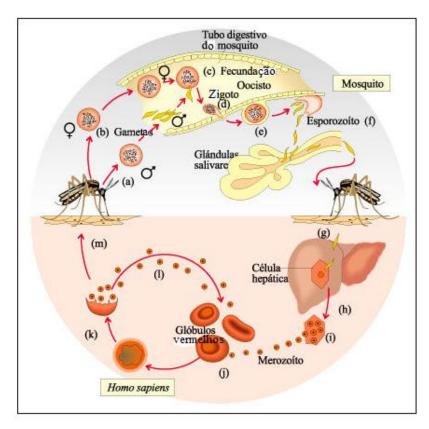
Figura 4 Lâminas mostrando a obstrução capilar por eritrócitos parasitados (aumento: x1.000), (A) corte do cérebro e (B) miocárdio.

Os protozoários do gênero *Plasmodium* têm um ciclo de vida dividido entre um hospedeiro vertebrado e um inseto vetor. O vetor é sempre um mosquito fêmea do gênero *Anopheles*, embora das 380 espécies conhecidas de mosquitos desse gênero, apenas 60 possam transmitir a doença. No Brasil, o principal anofelino transmissor da malária é o *Anopheles darlingii*. Na África o principal vetor da malária é o *Anopheles gambiae*, que diferencia do vetor brasileiro por sua alta voracidade e antropofilia (FRATUS, 2008).

A infecção nos hospedeiro vertebrado inicia-se quando esporozoítos infectantes são inoculados nos humanos, durante o repasto sanguíneo, pelo inseto vetor. Apesar de não possuir cílio e flagelos, em aproximadamente 30 minutos, os esporozoítos chegam as células do fígado (hepatócitos). Após invadir os hepatócitos, se diferenciam por reprodução assexuada do tipo esquizogonia, dando origem a milhares de merozoítos tissulares que posteriormente invadirão os eritrócitos. Essa primeira fase é denominada exo-eritrocítica, e, portanto, precede o ciclo sanguíneo do parasito (FUNASA, 2001; REY, 2001; FRANÇA et al, 2008).

O ciclo eritrocítico inicia-se quando os merozoítos tissulares invadem os eritrócitos, que se multiplica por esquizogonia, produzindo de 12 a 16 merozoítos por esquizonte (eritrócitos contaminados). A duração deste estágio eritrocítico depende da espécie de parasita, sendo de 24 h para o *P. knowlesi*, 48 h para o *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. ovale*, 72 h para o *P. malarie* (FUNASA, 2001; REY, 2001; FRANÇA et al, 2008; COX-Singh e SINGH, 2008).

A maior parte dos merozoítos liberados durante a eclosão dos esquizontes invadem outros eritrócitos ou diferenciam-se em formas sexuais masculinas e femininas (gametócitos). Estas formas são as únicas formas capazes de evoluir no inseto, dando origem ao ciclo sexuado ou esporogônico. Os gametócitos permanecerão na corrente sanguínea até serem ingeridos por um mosquito fêmea durante o repasto sanguíneo. No intestino do mosquito, os gametócitos masculinos fecundam os gametócitos femininos gerando o zigoto, que após torna-se móvel é chamado de oocineto. Estes atravessam a parede do intestino do mosquito e formam um cisto na parte exterior, chamados de oocistos. Em alguns dias, eles sofrem esporogenia e se rompem, liberando centenas de esporozoítos, que serão disseminados por todo o corpo do inseto através da hemolinfa até atingir as células das glândulas salivares, prontos para serem injetados em outro hospedeiro vertebrado (Figura 05a a 05f) (FUNASA, 2001, REY, 2001; NEVES, 2005).



Fonte: http://iescarin.educa.aragon.es

Figura 5 Ciclo de vida do *Plasmodium falciparum*.

1.1.6 Quimioterapia Antimalárica

A quimioprofilaxia antimalárica é um tratamento adequado e oportuno da malária e hoje é uma das principais estratégias para o controle da doença. Segundo Cunico et al (2008) ela precede à descrição do ciclo de vida dos parasitas, onde padres jesuítas, no século XVII, observaram que indígenas da América do Sul, utilizavam chás e bebidas preparadas com a casca de uma árvore nativa do Peru para o tratamento de alguns tipos de febres. Esta planta, posteriormente nomeada *Cinchona sp*, deu origem ao primeiro e um dos principais compostos no combate à malária: a quinina. Este antimalárico possibilitou a síntese de vários fármacos no combate a essa doença, como por exemplo, os compostos quinoléicos (Figura 6).

Outro importante fármaco foi a Artemisina, que tem sua origem de uma árvore típica da China, Ginghao (*Artemisia annual*). Esta planta foi utilizada durante milênios também no tratamento de febres. A partir dela, vários outros compostos foram sintetizados, como o Artemeter, Artesunato, Ácido Artenílico e mais recente o Diidrortemisina (Figura 07) (PRINCE, 2000; CUNICO et al, 2008).

Há alguns anos, a artemisinina e seus derivados compostos, eram quase exclusivos na China. No entanto, em 2007, este antimalárico foi introduzido no Brasil como tratamento de primeira escolha da malária *P. falciparum*. Essa introdução foi perceptível na redução do número de casos já em 2007, comparados com dados de 2006 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008, 2013).

Esses antimaláricos são baseados em produtos naturais e podem ser classificados de acordo com suas características químicas: Quinolinometanóis naturais: quinina (Figura 6a); 4-aminoquinolinas: cloroquina (Figura 6b) e amodiaquina (Figura 6c); 8- aminoquinolinas: primaquina (Figura 6d); Quinolinometanóis sintéticos: mefloquina (Figura 6e) ; Fenantrenometanóis: halofantrina (Figura 6f); Lactonas sesquiterpênicas: derivados da artemisinina - Artemeter, arteeter, artesunato, Ácido artelínico, diidroartemisinina ; Naftacenos: tetraciclinas (doxiciclina); Lincosaminas: clindamicina (Figura 7). (FUNASA, 2001; PIMENTEL et al., 2007).

a) b) c)
$$C_{F_3}$$
 C_{F_3} $C_{F_$

Fonte: CUNICO et al, 2008

Figura 6 Estruturas das moléculas das principais drogas antimaláricas.

Fonte: CUNICO et al., 2008

Figura 7 Estrutura dos derivados da Artemisinina.

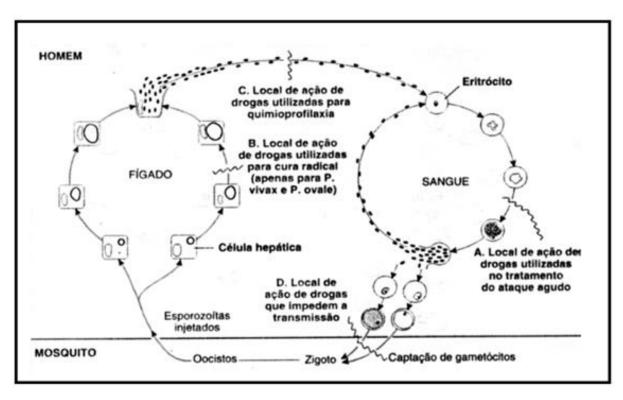
Ainda hoje, há uma busca na identificação de novos alvos terapêuticos e na descoberta de novas substâncias que atuem nesses alvos, resultando em novos fármacos no combate a malária. Como os dois principais compostos antimaláricos (e que deram origem a tantos outros) tem origem vegetal, a importância de buscar novos e eficazes medicamentos a baixo custo. Deve-se levar em consideração a crescente mobilidade de pessoas e animais nas regiões onde a malária é endêmica, para o combate da mesma.

A decisão de como tratar o paciente com malária deve ser precedida e levada em consideração às seguintes informações: gravidades da doença, espécie de plasmódio, idade do paciente, história de exposição anterior à infecção, susceptibilidade dos parasitos da região aos antimaláricos convencionais e custo da medicação (NEVES et al., 2005).

Para um tratamento positivo é necessário atingir o parasito em pontos chaves de seu ciclo evolutivo, diversas drogas são utilizadas, cada uma delas agindo de forma específica tentando impedir o desenvolvimento do parasita hospedeiro (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008). Esses fármacos são classificados de acordo com a sua ação contra diferentes estágios do ciclo de vida do parasita, sendo eles:

1. <u>Esquizonticida tecidual:</u> atuam destruindo os parasitos durante o ciclo pré-eritrocítico, impedindo o aparecimento do parasita na fase sanguínea e, portanto, das manifestações clínicas da malária (Figura 8A). Exemplos de drogas, que agem durante a infecção, impedindo as recaídas, primaquina, perimetamina, quinocida, cloroguanida.

- 2. <u>Esquiozonticida hemática:</u> atuam nos parasitas presentes nos eritrócitos do homem (figura 8, B e C). São chamados de supressivos, por suprimirem a sintomatologia.
- 3. <u>Gametocitocidas</u>: matam as formas sexuadas (gametócitos) do parasita de um indivíduo infectado, interrompendo a cadeia de transmissão do parasita (Figura 8 D). As drogas gametocíticas, são muito interessantes para a medicina preventiva. São exemplos de drogas desse tipo a cloroquina, a primaquina e a quinina.
- 4. <u>Esporonticidas</u>: atuam contra os esporozoítos, matando o parasita assim que ele entra na corrente sanguínea, ou destruindo-os quando são liberados pelos esquizontes hepáticos ou sanguíneos. Fármacos com atividades esporontocial são a primaquina e a pirimetamina (REY, 2001; RODRIGUES, 2003; FRANÇA, 2008).



Fonte: RODRIGUES, 2003

Figura 8 Local de ação das drogas antimaláricas no ciclo de vida do parasita.

1.1.7 Resistências aos quimioterápicos

A resistência aos antimaláricos tem ampla distribuição no mundo e é um dos entraves para o controle da malária, valendo lembrar que a disseminação de cepas de *P. falciparum* resistentes à cloroquina, hoje, praticamente se sobrepõe à distribuição geográfica da endemia (NORONHA et al., 2000). Ela surge entre outras causas, pelo uso permanente e em grandes

quantidades das drogas antimaláricas, utilização de esquemas terapêuticos de forma inadequada, automedicação, possível vantagem biológica dos parasitas resistentes sobre os sensíveis, além de fatores imunológicos ligados ao hospedeiro (COUTO et al., 1993).

Outro possível fator de resistência pode estar ligado a expressão dos VSA (variant surface antigens), antígenos ligantes e variantes, que ficam na superfície da hemácia infectada, durante o período intra-eritrocitário, promovendo uma série de modificações nos eritrócitos infectados. Estas proteínas ficam expostas na membrana do eritrócito e a aquisição de anticorpos contra varia dos de VSAs, tem sido considerada componente importante para o desenvolvimento de imunidade ao *P. falciparum* (BULL e MARCH, 2002; FRATUS, 2008)

Apesar da prevalência da resistência à cloroquina, esta droga continua sendo utilizada devido ao seu baixo custo e disponibilidade nos países afetados. Juntamente a esta droga, o antifolato, artesunato e a mefloquina constituem-se nas únicas formas de tratamento da malária a custo baixo. Porém, cepas se desenvolvem rapidamente, e contribuem pelas atuais taxas inaceitáveis de falha de tratamento da malária na Ásia e África subsaariana (PLOWE, 2005).

Segundo relatos de Moore & Lanier (1961) *apud* Di Santi *et al* (1988), os primeiros casos de resistência à cloroquina aconteceram em 1961 na Colômbia. Atualmente numerosas regiões apresentam graves problemas da resistência a esta 4-aminoquinoleína, incluindo o Sudeste Asiático e mais recentemente a África.

O quinino, outro antimalárico conhecido por ser utilizado há vários séculos no Ocidente, teve seu primeiro relato de resistência no Brasil, em 1910. Durante algum tempo, seu uso foi praticamente abandonado devido ao aparecimento de antimaláricos sintéticos, só voltando a ser empregado depois do aparecimento de resistência do *P. falciparum* aos demais medicamentos. Ainda hoje, essa droga é preconizada pela OMS, no tratamento de malária (Di SANTI et al, 1988; REY, 2001; CUNICO et al, 2008).

Outro antimalárico muito importante é a mefloquina. Ela é considerada uma alternativa terapêutica apropriada para o tratamento de *P. falciparum* resistentes aos demais antimaláricos, sendo que sua dose requer menos de um décimo da dose de quinino e pode ser administrada em dose única. Apesar desse medicamento ser relativamente novo, casos de resistência já foram descritos (Di SANTI et al, 1988; FRANÇA et al, 2008).

Já foram relatados casos de resistência do *P. falciparum* a todas as classes de antimaláricos. Até pouco tempo, a artemisinina era uma dos únicos antimaláricos sem relatos de resistência (Tabela 1). Entretanto, foi relatado, nos últimos anos, sua resistência em quatro países da região do Grande Mekong: Camboja, Mianmar, Tailândia e Vietnã. Estes casos

provavelmente estão ligados, embora muitos fatores contribuíssem para o surgimento e disseminação da resistência, pela aplicação das monoterapias de artemisinina (OMS, 2013).

Apesar desses casos, os compostos a base de artemisinina, diminuem rapidamente a população do parasita e tem um tempo de eliminação muito rápido. Também já existem cepas de *P. vivax* resistentes à cloroquina, amodiaquina e a hidróxicloroquina (CUNICO et al, 2008).

Tabela 1 Resistência aos antimaláricos: Ano de introdução e Primeiro relato de resistência. Adaptado de Wongsrichanalai et al, 2002.

Drogas	Ano de Introdução	Primeiro Relato de	Diferença (anos)
antimaláricas		resistência	
Quinina	1632	1910	278
Cloroquina	1945	1957	12
Proguanil	1948	1949	1
Amodiaquina	1951	1971	20
Artemisinina	1971		
Mefloquina	1977	1982	5
Halofantrine	1988	1996	2
Atovaquone	1996	1996	0

1.2 PLANTAS MEDICINAIS E BUSCA POR NOVAS DROGAS

As plantas medicinais são toda e qualquer planta que serve de alguma maneira, para o tratamento de um problema de saúde, tendo efeito definido sobre doenças e sintomas, ou que seja comprovada sua eficácia comprovada cientificamente, onde o seu emprego para fins terapêuticos está relacionado a um baixo custo e facilidades de aquisição (CARDOSO, 2004).

A utilização de produtos naturais como recursos terapêuticos é tão antiga quanto à civilização humana, e por muito tempo, produtos minerais, vegetais e animais constituíram o único arsenal terapêutico presentes. Porém com o advento da Revolução Industrial e o desenvolvimento da química orgânica, os produtos sintéticos foram adquirindo primazia no tratamento farmacológico. Isto ocorreu, entre outros fatores, pela maior facilidade de obtenção de compostos puros, com o desenvolvimento de processos de modificações

estruturais (como vistas a fármacos mais ativos e seguros) e pelo crescente poder econômico das grandes companhias farmacêuticas (EISENBERG et al, 1998).

Apesar desse grande avanço na medicina alopática, existem obstáculos básicos na utilização pelas populações carentes, que vão desde acesos aos centros de atendimento hospitalares até à obtenção de exames e medicamentos. Motivos esses que têm levado a utilização de plantas medicinais com fins terapêuticos nos países em desenvolvimentos, associados com a fácil obtenção e grau de tradição do seu uso, (VEIGA Jr. et al, 2005).

Outro fator a destacar é o crescente avanço científico nos estudo com plantas medicinais. Isso porque ter conhecimento sobre os processos de biossíntese, bem como as substâncias orgânicas presentes na planta, parte delas responsáveis na aplicabilidade na alimentação e saúde, são estímulos ao desenvolvimento do estudo de muitas plantas (SANTOS, 2002).

Estímulos esses que têm levado sua aprovação em órgãos médicos e sua eficácia comprovada cientificamente. Analisando-se os princípios ativos, pode-se classificar terapeuticamente as plantas de acordo com o efeito farmacológico e no combate à agentes patológicos, como por exemplo, os antimaláricos (CUNICO et al, 2008).

Devido a este e a vários outros fatores é que se tem notado o crescente aumento no uso desses fitoterápicos como terapêuticos, nos últimos anos. Atualmente o mercado mundial de fitoterápicos gira em torno de 22 bilhões de dólares. No Brasil, não existe dados oficiais atualizados, porém estima-se que esse mercado gira em torno de US\$ 160 milhões por ano. E o fator de atração é o ritmo de crescimento das vendas internamente, mais de 15% anuais, contra 4% do que evoluem as vendas dos medicamentos sintéticos (YUNES, PEDROSA & CECHINEL Filho, 2001).

Outro ponto a se ressaltar é a quantidade de plantas existente no planeta, sendo que a maioria é desconhecida sob o ponto de vista científico, onde de 250-500 mil espécies, somente cerca de 5% têm sido estudadas fitoquimicamente e uma porcentagem menor avaliadas sob os aspectos biológicos. (CECHINEL Filho e YUNES, 1998).

Dentre as plantas que são utilizadas como recursos terapêuticos antimaláricos, a *Bertholletia excelsa H.B.K.*, conhecida como castanha-do-Brasil, é uma delas (FRANCO e FONTANA, 2004; PINTO, 2008; LORENZI, 2008; FERREIRA, 2009).

1.3 CASTANHA-DO-BRASIL - Bertholletia excelsa H.B.K

1.3.1 Características Gerais e Botânicas

A castanheira foi descrita pela primeira vez em 1808, quando HUMBOLDT e BOMPLAND, e posteriormente KUNTH, denominaram a árvore majestosa presente na Floresta Amazônica (PACHECO, 2007). O Ministério da Agricultura por meio do decreto 51.209 de 18/09/1961, para efeito de comércio exterior, regulamentou a denominação de Castanha-do-Brasil (BRASIL, 1961).

Pela classificação botânica pertence à classe Angiospermae, ordem Dicotiledônea, a família Myrtiflorae, família Lecythidacea, gênero Bertholletia e a espécie: *excelsa*. A família tem 325 tipos de árvores nos trópicos americanos, divide-se em 15 gêneros, em que o *Bertholletia* é dominante com 75 espécies (BRASIL, 2002).

A castanheira é o nome popular mais conhecido da *B. excelsa*, mais ela também tem outros nomes como: castanha-do-brasil, touca, juviá, castanheira-do-brasil, nuez del brasil (casteliano); brazil nut, brazilnut, brazilnut-tree, creamnut, paranut (inglês), castagna di Pará (italiano) (FONSECA, 2009).

Encontram-se em agrupamentos mais ou menos extensos denominados castanhais. Sua área de ocorrência (figura 9) vai desde o extremo sul das Guianas até o Alto Beni - 14 ° de latitude Sul no sul do Mato Grosso (MULLER et al, 1980); seu limite leste encontra-se a noroeste do Maranhão, bacia do Rio Gurupi, estando ausente em toda a parte ocidental da hiléia em ocorrência espontânea (DUCKER e BLACK, 1954). No Brasil ocorre nos estados do Maranhão, Mato Grosso, Pará, Acre, Rondônia, Amapá, Roraima e Amazonas (ARAÚJO et al, 1984).

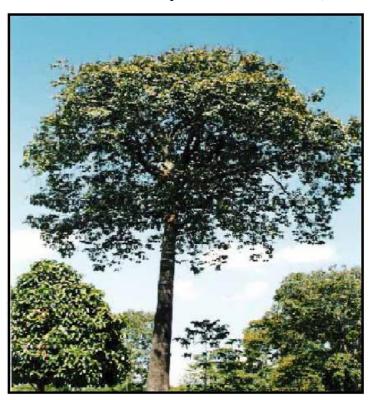
Elas são classificadas como árvores e possuem grande porte, uma vez que na fase adulta podem atingir mais de 60 m de altura e a base do tronco pode alcançar mais de 4 m de diâmetro (Figura 12). Possui casca escura e fendida, ramos encurvados nas extremidades, folhas esparsas, alternadas, pecioladas (pecíolo cilíndrico-caniculado), oblongas ou ovalado-oblongas, curto acuminadas, onduladas, verde-escuras na parte superior e pálida na inferior (BRASIL, 1976; SANTOS et al, 2006).

Seu fruto, chamado de ouriço, é uma cápsula (pixídio) globosa deprimida, quase esférica, de 08 a 16 cm de diâmetro, com peso médio de 750 g. Sua cápsula resistente não se

abre espontaneamente e abriga em seu interior um número variado de sementes, entre 10 a 25 (BRASIL, 2002; PACHECO, 2007)

As sementes, denominadas castanhas, por sua vez, cujo tamanho varia entre 4 a 7 centímetros de comprimento, representam cerca de 25% do fruto e têm uma casca dura e rugosa e encerram a amêndoa, que é altamente nutritiva e calórica (cerca de 650 Kcal / 100 gramas de amêndoa). O ouriço cai quando maduro e aí são coletados no chão para a extração da castanha (BRASIL, 2002; NAOZUCA, 2008).

É um dos produtos da nossa economia extrativista, com significado valor no mercado de exportação. Devido à devastação indiscriminada das matas amazônicas, a castanheira nativa tem sido vista como uma das espécies ameaçadas de extinção, porém tem-se verificado que esta espécie é uma excelente alternativa para o reflorestamento (BRASIL, 2002).



Fonte: Adaptada de MELO, 2006

Figura 9 Indivíduo da castanha-do-Brasil (B. excelsa).

1.3.2 Indicações Terapêuticas e Principais Constituintes Químicos

Na medicina popular a casca é utilizada como chás ou sumo para o tratamento de moléstias crônicas do fígado e como antimalárico. A parte utilizada da casca é a parte interna ou a entrecasca e de maneira geral, pode ser extraída do caule, embora possa ser retirada de

galhos mais grossos para a redução do risco de prejudicar a planta (FRANCO e FONTANA, 2004).

O suco do fruto, ou seja, a água quem fica curtida no ouriço, é tradicionalmente usado pelos indígenas como agente antimalárico e pela população em geral no tratamento contra hepatite (BRANDÃO et al, 1992).

A amêndoa, chamada de castanha, gera diversos benefícios à saúde humana, apresentando principalmente propriedades anticarcinogênicas e antioxidante (KANNAMKUMARATH et al, 2002). Ela é rica em muitos nutrientes, sendo os principais: água, lipídios, carboidratos, sais minerais, fibras, cálcio, fósforo, vitaminas A, B1 e B2 e além de elementos minerais como o bário, bromo, cobalto, césio, magnésio, níquel, rubídio, selênio, dentre outros. Encontrados no azeite, ressaltam-se os principais ácidos graxos como o ácido palmítico, oléico, linoléico e pequenas quantidades de ácido mirístico, esteárico e fitosterol (MELO, 2006).

Para o uso da planta na medicina popular, a coleta do material (ouriço e a entrecasca) não pode ser dar ao acaso. O conhecimento do momento correto da coleta leva à obtenção de produtos de melhor qualidade. Como afirma Simões et al (2003), "Para conseguir maior quantidade de princípios ativos no tecido da planta, a coleta deve ser realizada em períodos específicos, podendo esta variação ocorrer tanto no período de um dia, como em épocas do ano". No caso do fruto, para um sucesso na colheita ele deve estar bem maduro; já para a casca a melhor época é no outono e início do inverno (EMATER-DF, 1988 *apud* SIMÕES et al, 2003).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antimalárica, in vitro e in vivo, dos compostos provenientes da Bertholletia excelsa (casca da árvore e do ouriço) contra os Plasmodium falciparum e Plasmodium berghei.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a bioprospecção dos principais constituintes químicos da casca e do ouriço da B. excelsa;
- Avaliar da citotoxicidade in vitro dos extratos e frações da casca e do ouriço da B.
 excelsa, usando linhagens celulares primárias (macrófagos);
- Avaliar a atividade dos extratos e frações da casca e do ouriço da B. excelsa através dos testes in vitro (contra cepa cloroquina – sensível 3D7 Plasmodium falciparum) e in vivo (modelo black – Plasmodium berguei);
- Determinar a viabilidade celular;

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1 COLETA E IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA

A coleta da entrecasca ocorreu no dia 11/09/11 (por volta de 11:00 da manhã, dia ensolarado); a coleta do ouriço ocorreu no dia 25/10/11 (entre 15:00 e 16:00, dia ensolarado). Essa coleta foi feita no município de Canutama-AM, no Km 59 BR 319, na linha 2, lote 61 (Figura 10).



Figura 10: Foto satélite do local de coleta das partes da planta da *Bertholletia excelsa* (8'13 12 49" S 64'01 02 51" O)

Para não haver prejuízo a planta, a entrecasca foi retirada na parte inferior (rente ao solo), e os ouriços coletados no chão. Foram coletados 1,340 kg de casca e 2,101 kg do ouriço (sem as amêndoas). Após a coleta as partes foram lavadas, e secas em temperatura ambiente por 48h ou até estabilização do peso. Posteriormente foram trituradas, moídas e secas em levadas à estufa a temperatura constante de 37° C. Essa secagem tem por finalidade impedir a reação de hidrólise e de crescimento bacteriano (BACHI, 1996).

Uma amostra representativa da espécie foi classificada e depositada no Herbário Rondoniense João Geraldo Kuhlmann (Universidade Federal de Rondônia), sob

responsabilidade do Msc. Narcísio Costa Bigio, onde a planta encontra-se identificada com registro nº 903.

3.2 OBTENÇÃO DE EXTRATOS E FRAÇÕES

A extração e o fracionamento do material foram realizados no Laboratório de Fitoquímica – LABFITO da UNIR. Após o processo de secagem, o material foi pesado, onde obteve-se 1,283 kg da casca e 1,984 do ouriço. O material vegetal (casca/ouriço) foi extraído, separadamente, pelo método de percolação a frio, utilizando EtOH 98% como líquido extrator (MACIEL et al, 2002). Esse material ficou em contato com o solvente por 7 dias. Após esse tempo o material foi filtrado e o solvente foi evaporado em evaporador rotatório (FISATOM mod. 802A) (Figura 11) para obtenção do extrato. Esse procedimento foi repetido mais uma vez com o material vegetal que restou.



Figura 11: Evaporação do solvente em evaporador rotatório.

A extração aquosa foi realizada com o material vegetal proveniente da extração etanólica, onde o material foi submerso em água destilada durante 10 (dez) dias. Após esse período o material foi filtrado, obtendo-se a solução aquosa. A solução foi congelada à -20° C e liofilizada, com a finalidade de desidratar totalmente o extrato aquoso. Esse procedimento foi feito no Laboratório de Biogeoquímica da UNIR, sob a coordenação do Dr. Wanderley Bastos. Os extratos foram pesados, obtendo-se assim a massa total (Tabela 2).

Tabela 2 Massa dos extratos provenientes da extração alcoólica e aquosa.

Material vegetal B. excelsa	Massa (g)
Casca (extrato EtOH)	326,48
Ouriço (extrato EtOH)	15,84
Casca (extrato aquoso)	4,33
Ouriço (extrato aquoso)	4,32

Os extratos etanólicos da casca (5 g) e do ouriço (10,3 g) foram submetidos ao fracionamento em coluna cromatográfica, utilizando-se como fase estacionária sílica gel 60, 35-70 mesh (Merck), onde as colunas variaram as dimensões de acordo com a quantidade da amostra.

Inicialmente foi preparada uma pastilha com os extratos etanólicos (extrato etanólico adsorvido na sílica gel), que foi colocada na coluna cromatográfica que já continha sílica gel. A coluna foi eluída com solventes em gradiente de polaridade, seguindo a sequencia: éter de petróleo, CHCl₃, EtOAc, acetona, MeOH. Foram recolhidas frações de 50 mL e as frações do mesmo solvente foram reunidas e o solvente foi evaporado, obtendo-se assim os respectivos eluatos. As frações foram pesadas e armazenadas em frascos ambares (Tabela 3).

Tabela 3: Massa obtida após o fracionamento por coluna cromatográfica

Eluato	Casca (g)	Ouriço (g)
Éter de petróleo	0,01	-
CHCl ₃	0,09	1,42
EtOAc	0,40	3,99
Acetona	1,13	0,81
MeOH	1,96	2,45

3.3 BIOPROSPECÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS

Os extratos etanólicos, frações, foram submetidos a testes específicos para as principais classes de substâncias, sendo realizados segundo Merck (1972).

3.3.1 Esteroides e Terpenos

Os testes para esteroides e terpenos foram realizados pela reação de Lieberman-Burchard. Em um Becker de 5 mL foram colocados 2 mL do extrato e 2 mL de CHCl₃, em seguida a solução clorofórmica foi filtrada através de um funil para um tubo de ensaio. No tubo de ensaio, adicionou-se 1 mL de anidrido acético, agitando suavemente, e acrescentou-se cuidadosamente 3 gotas de H₂SO₄. A coloração evanescente seguida de verde permanente indica presença de esteroides livres, e a coloração entre pardo e vermelho indica a presença de triterpenóides pentacíclicos livre.

3.3.2 Flavonóides

Realizou-se o teste de cianidrina ou Shinoda (HCl concentrado e Mg metálico). Em um tubo de ensaio foi colocado 2 mL do extrato e adicionou-se, aproximadamente 0,5 cm de Mg metálico em fita e 1 mL de HCl concentrado. O fim da reação deu-se pelo término de efervescência. O aparecimento de coloração que variou entre pardo e vermelho, indicou a presença de flavonóides.

3.3.3 Quinonas

Dois gramas do material vegetal foram colocados em um tubo de ensaio e adicionado 4 mL de éter etílico, com agitação por 2 min. Após a agitação foi adicionado 1 mL da solução de hidróxido de sódio a 10%, o surgimento da coloração róseo-vermelha indicava teste positivo para quinonas.

3.3.4 Fenóis e taninos

Em um tubo de ensaio foi adicionado 3 gotas de solução de FeCl₃ onde continha o extrato, o tubo foi agitado. A coloração variável entre azul e vermelho indica presença de fenóis e um precipitado escuro de tonalidade azul, indica presença de taninos pirrogálicos (taninos hidrolisáveis). No caso de formação de um precipitado verde indica a presença de taninos flobatênicos.

3.3.5 Alcalóides

Em um tubo de ensaio foram colocados 2 mL do extrato que foi alcalinizado com 15 gotas de NaOH 1%, acrescido de 2 mL de água e 2 mL de CHCl₃. A fase aquosa foi desprezada e acrescentou-se a 15 gotas de HCl 1% a fase clorofórmica, em seguida a fase orgânica foi extraída com 2 ml de água. A fração clorofórmica foi desprezada e à fase aquosa ácida foi acrescentada 3 gotas do reagente de Dragendorff. A formação de precipitados insolúveis de cor laranja, floculoso confirma a presença de alcaloides.

Reagente de Dragendorff: 8 g de subnitrato de bismuto foram dissolvidos em 20,0 ml de HNO₃ 30%. Em separado, 22,8 g de KI foram dissolvidos em um volume mínimo de água. A primeira solução foi vertida pouco a pouco sobre a segunda, deixando em repouso durante algumas horas, sendo posteriormente filtrado. A mistura foi colocada em um balão volumétrico de 100 mL, completando o volume com água destilada. A solução foi guardada ao abrigo da luz até o seu uso.

3.4 CULTIVO DO PARASITO

Os ensaios biológicos *in vitro* e *in vivo* foram realizados no Laboratório de Biologia de Malária e Toxoplasmose - LABMAT da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, sob coordenação do Prof^o Dr. Valter F. de Andrade Neto.

3.4.1 Manutenção do Plasmodium falciparum

As cepas do *P. falciparum* cloroquina-sensível (3D7) foram descongeladas e mantidas em cultura de suspensão de hemácias humanas de doadores voluntários do sistema ABO do tipo A e fator Rh positivo (+) ou O⁺ com hematócrito de 5%, seguindo fundamentalmente a técnica de Trager e Jansen (1976), adaptando alguns passos que não afetaram as condições para manter os eritrócitos viáveis (ANDRADE Neto et al, 2004).

O cultivo foi realizado em meio completo composto por RPMI 1640 (Sigma) suplementado com 5% de plasma humano desfibrinado A⁺ ou O⁺ ou com albumax (Gibco) na concentração final de 1%; Hepes 22,8 mM; glicose 11,1 mM (Sigma); HPX 0,36 mM (50 μg.ml⁻¹) Sigma – quando utilizado; NaHCO₃ 23,8 mM (Merck); gentamicina 40 μg.ml⁻¹ (Sigma).

Os parasitos foram mantidos em estufa a 37° C, condicionados em garrafas plásticas de cultura de 25 cm^2 (Sarstedt) sob uma tensão de gases (5% de $O_2 + 5\%$ de $CO_2 + N_2$ balanceado) ou no dessecador a vela segundo a técnica de Trager e Jansen (1976). O acompanhamento do desenvolvimento do plasmódio foi realizado através da preparação estendidas em lâminas (esfregaço) para análise em microscópio óptico. Os esfregaços foram corados com Giemsa, e observado em aumento de 1000X.

3.4.2 Manutenção do Plasmodium berghei

As cepas da linhagem NK-65 de *Plasmodium berguei* foram mantidas rotineiramente através da passagem do sangue infectado com parasito, retirado de camundongo anteriormente infectado e inoculado em camundongos sadios, por via intraperitonial, usando 3,8% de citrato de sódio como anticoagulante.

3.5 TESTES ANTIMALÁRICOS in vitro – Plasmodium falciparum

Para o teste, a cultura foi sincronizada com sorbitol para predominância de trofozoítos a 1-2 % de parasitemia e 3 % de hematócrito. As amostras dos extratos e das frações da planta foram diluídas em água destilada na concentração estoque de 10 mg.mL⁻¹, e posteriormente diluídas em meio completo para obtenção de cinco diluições (1:2) seriadas (100, 50, 25, 12,5, 6,1 μg.mL⁻¹).

Placas de 96 poços foram incubadas com 180 μL de hemácias infectadas com a cepa 3D7 e 20 μL dos compostos nas referidas concentrações por 48 h a 37 °C. Cada concentração foi testada em duplicata. A cloroquina foi utilizada como controle positivo, na concentração inicial de 2,5 μg.mL⁻¹ em sete diluições (1:3) seriadas. Como controle negativo foi utilizado apenas o meio de cultura e hemácias. Após 48 h, esfregaços sanguíneos foram realizados e corados com Giemsa e observados microscopicamente (magnificação de 1000x) para observação da parasitemia de cada poço.

O efeito antiparasitário foi medido por percentagens de inibição de crescimento do parasito em relação ao grupo controle - parasitos cultivados em meio livre de droga (CARVALHO e KRETTLI, 1991). Posteriormente, os resultados das médias possibilitaram a elaboração de gráficos dispostos em regressão linear para a obtenção do CI₅₀ (Concentração Inibitório de 50%), sendo o Anova de um fator - Student-Newman-Keuls, o teste utilizado para comparar as diferenças entre as concentrações do mesmo composto. O controle sintético

utilizado foi a cloroquina, ao qual o *P. falciparum* já desenvolveu resistência (ZALIS et al., 1993).

3.6 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE in vitro

Para o ensaio de citotoxicidade *in vitro* foram utilizadas células Raw (macrófagos de camundongos), mantidas em cultura contínuas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), suplementados com 10% de soro fetal bovino, em atmosfera de microaerofilia (5% CO₂, 2% O₂ e balanço de N₂) a 37° C. A citotoxicidade dos extratos e frações da *B. excelsa* foi determinada usando o ensaio colorimétrico metiltiazoltetrazólio (MTT) (MOSMANN, 1983).

Para o ensaio com os macrófagos, as células foram tripsinadas, lavadas, suspendidas em meio RPMI sem SBF, sendo realizada a contagem de macrófagos em câmaras de Neubauer. Após a suspensão, as células foram distribuídas em 96 poços por placa (1x10⁵ células/poço), sendo incubadas em estufa de CO₂ por 24 h a 37° C. Decorrido esse tempo, os extratos e frações foram diluídas em H₂O destilada e testadas em sete concentrações entre 100 – 1,5μg.mL⁻¹, em triplicata. Paralelamente foi realizado um grupo controle constituído de meio RPMI 1640 sem soro fetal bovino.

Após período de 24h de incubação dos extratos a 37° C, 100 μL de MTT (5 mg.mL⁻¹ em meio RPMI 1640, sem soro fetal bovino e sem vermelho fenol) foram adicionados a cada poço. Após 3 h de incubação em estufa de CO₂ a 37° C, o sobrenadante foi removido e adicionou-se 100 μL DMSO em cada poço. A absorbância de cada poço foi obtida através de leitura em espectrofotômetro com filtro de 570nm. Valores da concentração citotóxica (CC₅₀) foram obtidos através de curvas de concentração droga-resposta. Os resultados foram expressos em média±desvio padrão.

Para comparar as diferentes concentrações do mesmo composto em relação ao controle sem tratamento, foi usado Anova de um fator utilizando o teste Student-Newman-Keuls.

3.7 ANIMAIS E COMITÊ

Fêmeas adultas de camundongos Black foram utilizadas para o ensaio *in vivo*. Os animais foram obtidos do biotério da Universidade Federal do Rio Grande do Norte e

receberam água e alimento *ad libitum*. Seu uso foi aprovado pelo comitê de ética para uso de animais (CEUA – UFRN n° 043/2010).

3.8 ENSAIO ANTIMALÁRICO in vivo – Plasmodium berghei

Os teste antimaláricos *in vivo* foram realizados de acordo com Peters (1965) modificado por Carvalho et al (1991). Inicialmente, camundongos Black adultos foram divididos randomicamente em grupos de quatro animais por gaiola. No dia zero, cada camundongo foi infectado por via intraperitonial, com um inoculo de 1x10⁵ eritrócitos infectados. Os compostos foram testados por via oral (gavage) durante quatro dias consecutivos, após a infecção do camundongo. A fração EtOAc foi diluídas em água destilada, onde administrou-se oralmente 200 µL/dia por animal, nas seguintes doses 500 e 250 mg/kg/animal. A cloroquina foi solubilizada em água destilada e usada como droga controle de referência, na dose de 5 mg/kg/animal, administrada oralmente (200 µL/dia). Para o grupo controle negativo foi administrado água destilada (200 µL/dia). No 5° e 7° dia após a infecção, esfregaços sanguíneos foram realizados, corados usando Giemsa e observados em microscópio óptico para determinação da parasitemia. Os resultados foram expressos pelo percentual de redução de parasitemia em relação aos animais não tratados pela seguinte fórmula:

% inibição = <u>% parasitemia do controle - % parasitemia do grupo teste</u> x 100 % parasitemia do controle

A mortalidade foi monitorada nos grupos durante um período de quatro semanas seguintes à inoculação, onde o composto foi considerado ativo quando essa redução for maior ou igual a 30% (CARVALHO et al, 1991).

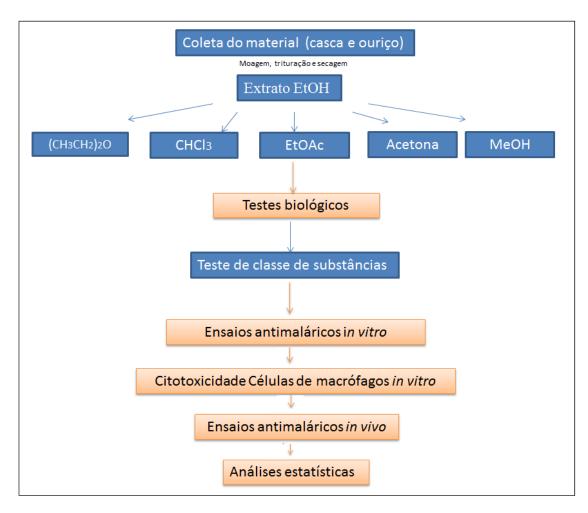


Figura 12 Esquema geral da metodologia dos ensaios fitoquímicos e biológicos

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 BIOPROSPECÇÃO DOS COMPOSTOS DA B. excelsa

A investigação e avaliação das propriedades químicas possibilita o conhecimento prévio e indicam a natureza dessas substâncias.

A abordagem etnofarmacológica de uma planta proporcionam informações essenciais para a descoberta de novos agentes terapêuticos com maior seletividade e alta atividade, sendo o ponto de partida para a validação de muitas plantas medicinais (MOTA, 2012).

Os testes com os extratos etanólicos da casca e do ouriço e suas respectivas frações, indicam a presença de algumas classes de substâncias, expressos na tabela 4.

Tabela 4: Principais metabólitos secundários encontrados nos extratos e frações *B. excelsa*.

	Casca				Ouriço			
	EEC	CHCl ₃	EtOAc	ACT	EEO	CHCl ₃	EtOAc	ACT
Esteroides	-	-	-	-	-	-	-	-
Triterpenos	+	-	+	-	-	-	-	+
Flavonoides	+	-	+	+	+	-	+	-
Quinona	-	-	-	+	-	-	-	-
Fenóis	+	-	+	+	-	-	-	-
Tanino	+	-	+	+	+	-	-	-

Legenda: EEC (Extrato etanólico da casa); EEO (Extrato etanólico do ouriço); CHCl₃ (Clorofórmio); EtOAc (Acetato de etila), ACT (Acetona).

Em um aspecto geral, verifica-se a presença expressiva de flavonoides, principalmente nos compostos da casca. Esse grupo de metabólitos representa um dos grupos mais importantes e diversificados, sendo amplamente distribuídas no reino vegetal. Suas propriedades farmacológicas e biológicas demonstram que eles possuem atividades antitumorais (ZUAZANI e MONTANHA, 2003), anti-inflamatória (FORMICA e REGELSON, 1995), antimicrobiana (CHAN et al, 1998) e antimutagênica (CALOMME et al, 1996); demonstrando o potencial biológico para esse grupo de metabólitos.

Em trabalhos fitoquímicos realizados com a casca da *B. excelsa* foram descritos a presença das seguintes classes de substâncias: ácidos orgânicos, açúcares redutores,

^{* (+)} Resultado para teste positivo, (-) Resultado para teste negativo.

heterosídeos, depsídeos, fenóis e taninos (CAMPOS et al, 2011; COSTA et al, 2012), fundamentando com os resultados do presente trabalho. Campos et al (2005), conseguiram isolar e identificar o ácido betulínico da fração hexânica derivada do extrato bruto da casca. A literatura também relata, o isolamento de saponinas e componentes fenólicos (MASSIOT et al, 1992), bem como alcaloides (PAL et al, 1994) em outras espécies da família Lecythidaceae

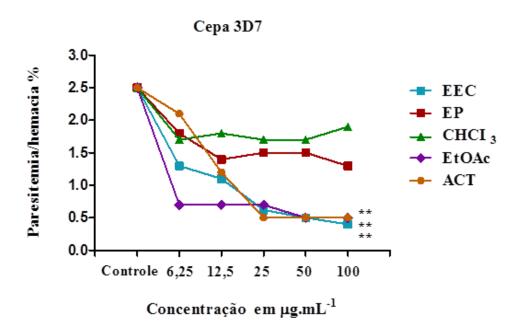
Relata-se também, a presença e isolamento de triterpenos em espécies da mesma família (CARVALHO et al, 1998).

As bioprospecção de classes de substâncias são importantes para se obter informações relevantes à cerca da presença de metabólitos secundários da planta, para que assim, cheguese a um isolamento de princípios ativos importantes na produção de um possível fitoterápico (SILVA et al, 2010).

4.2 ATIVIDADE ANTIMALÁRICA in vitro

A princípio foi realizado um *screning* com todas as frações para atividade antimalárica, com a finalidade de definir os compostos que apresentassem melhores resultados para dar continuidade aos testes de maior especificidade.

Os resultados dos experimentos demonstraram, em relação aos compostos da casca, que o extrato etanólico, a fração EtOAc e acetona foram os que mostram-se mais ativos contra cepa do *P. falciparum* - 3D7. Na análise do extrato da casca, observa-se uma bioatividade de mais de 83% na concentração de 100 µg.mL⁻¹, apresentando CI₅₀ de 6µg.mL⁻¹ (Figura 13).



* **Legenda:** EEC (extrato etanólico da casca); EP (fração éter de petróleo); CHCl₃ (Clorofórmio); EtOAc (Acetato de Etila); ACT (Acetona)

Figura 13 Atividade *in vitro* dos compostos da casca frente à cepa 3D7 - *P. falciparum*. Diferenças significativas (p<0,05) em relação ao controle são indicadas pelo símbolo (**).

Na fração EtOAc da casca, observou-se uma queda significativa em praticamente todas as concentrações, chegando a inibir 81% na concentração de 50 μg.mL⁻¹, e nas demais concentrações a média de redução foi em torno de mais de 73% (Figura 13). O CI₅₀ calculado para este composto foi de 0,1 μg.mL⁻¹. Na fração acetona, houve redução significativa da parasitemia, chegando a uma bioatividade de mais de 79% na maior concentração; esta fração apresentou um CI₅₀ de 15 μg.mL⁻¹.

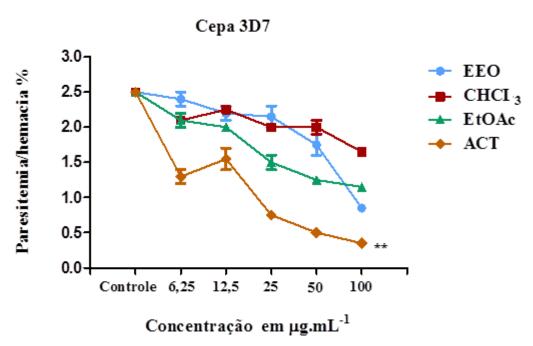
As frações éter de petróleo e CHCl₃ da casca não apresentaram uma redução significativa da parasitemia, nem mesmo na maior concentração (100 µg.mL⁻¹).

Como critério de avaliação e comparação para a atividade *in vitro*, estabeleceu-se que quando o percentual de inibição da parasitemia for entre 80 e 100% - drogas são consideradas ativas; entre 50 e 79% - parcialmente ativas e se o percentual de inibição for menor que 50% - drogas consideradas inativas (ANDRADE-Neto et al, 2003; ANDRADE- Neto et al, 2004; ANDRADE- Neto et al, 2007).

Em um aspecto geral dos compostos da casca, o extrato etanólico e as frações EtOAc e acetona foram consideradas ativos, pois na maior concentração (100 μg.mL⁻¹), inibiram mais que 80% do crescimento do parasita. Já as frações éter de petróleo e CHCl₃ foram

consideradas inativas, pois o percentual de inibição da parasitemia foi menor que 50%. As diferenças em relação ao controle foram significativas para o extrato etanólico, frações EtOAc e Acetona da casca

Em relação ao ouriço, o resultado mais expressivo foi observado na fração acetona, com um CI₅₀ de 10 μg.mL⁻¹, cujo percentual de inibição na parasitemia foi maior que 83% na concentração de 100 μg.mL⁻¹ (Figura 14). O extrato etanólico, apesar de inibir a parasitemia em mais de 65% na concentração de 100 μg.mL⁻¹, e apresentar um CI₅₀ de 77 μg.mL⁻¹ foi considerado parcialmente ativo, bem como a fração EtOAc que apresentou um CI₅₀ de 63 μg.mL⁻¹. A fração CHCl₃ do ouriço não mostrou-se ativa na redução da parasitemia; O CI₅₀ calculado para este composto foi de 554 μg.mL⁻¹ (Figura 14).



Legenda: EEO (extrato etanólico do ouriço); CHCl₃ (Clorofórmio); EtOAc (Acetato de Etila); ACT (Acetona).

Figura 14 Atividade *in vitro* dos compostos do ouriço frente à cepa 3D7 - *P. falciparum*. Diferenças significativas (p<0,05) em relação ao controle são indicados pelo símbolo (**).

A partir dos resultados observados nesse ensaio foram selecionados os extratos/frações considerados com maior atividade contra *P. falciparum*: da casca (extrato etanólico, frações EtOAc e acetona) e do ouriço (extrato etanólico, frações EtOAc e fração acetona) para testes mais específicos de citotoxicidade, com células Raw (macrófagos de camundongo) e *in vivo* com *P. berguei*.

Tendo em vista que a cloroquina é um antimalárico derivado de uma substância isolada de planta medicinal e apesar de possuir alta eficácia, baixa toxidade e custo, possui uma resistência que se sobrepõem à sua distribuição. Esse progressivo aumento da plasticidade genômica do parasito, somado à restrição do arsenal terapêutico no combate a essa enfermidade, torna-se necessário e urgente à procura por novos antimaláricos com alta eficácia e baixo custo, uma vez que a malária está ligada a uma população de baixo, e muitas vezes, nenhum poder aquisitivo (ENSERINK, 2010; MOTA et al, 2012).

Neste contexto, a procura por substâncias ativa derivadas de plantas medicinais tornase bastante promissora. Atualmente, cerca de 25% das drogas prescritas são derivadas ou foram inspiradas em substâncias isoladas de plantas; e cerca de 11% dos 525 fármacos considerados essenciais pela OMS, foram originados exclusivamente destas plantas (SIANI e MICHILES, 2005).

Na busca por novos possíveis antimaláricos derivados de plantas medicinais, Sousa (2010) demonstra a atividade da *B. excelsa* em avaliações *in vitro* contra cepas W2 (cloroquina-resistente) e 3D7 (cloroquina-sensível) do *P. falciparum* onde obtiveram resultados significativos. O estudo demonstrou que frente a linhagem W2 o extrato etanólico das casca e a fração EtOAc da casca, na concentração de 100 μg.mL⁻¹, houve uma inibição de mais de 95% da parasitemia. Na fração EtOAc da casca, a redução da parasitemia foi considerada ativa em todas as concentrações testadas. Esses resultados corroboram com os resultados obtidos no presente trabalho.

Outras atividades utilizando a *B*. excelsa foram determinadas em trabalhos relatados na literatura. Ensaios biológicos, realizados com o extrato e frações da casca da *B. excelsa*, mostraram também atividade significativa contra formas do *Trypanossoma cruzi*, evidenciando atividades biológicas promissoras para a *B. excelsa*. Nas frações acetônica e metanólica, constatou-se uma significativa atividade tripanossomicida, na concentração de 500 µg.mL⁻¹, ocorrendo redução em 100% e 90,3%, respectivamente (CAMPOS et al, 2005).

Em ensaios antimicrobianos, o extrato hidroalcoólico da casca da *B. excelsa* mostrou atividade contra bactérias Gram-positivas (CAMPOS et al, 2011) e Gram-negativas (COSTA et al, 2012).

As atividades tripanossomicidas (CAMPOS et al, 2005), antimicrobianas (CAMPOS, et al, 2011; COSTA et al, 2012), e antimalárica (SOUSA, 2010), evidenciam o potencial biológico da *B. excelsa* contra diversos micro-organismos. Esse potencial pode estar ligado aos compostos existentes nessa planta, principalmente o grupo de flavonoides, que possui

diversificadas ações farmacológicas e biológicas, sendo necessários testes mais específicos para comprovar essa ligação.

4.3 ATIVIDADE CITOTÓXICA

4.3.1 Compostos da Casca

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados com os extratos e frações que apresentaram os melhores resultados nos ensaios *in vitro*. Para os ensaios de citotoxicidade foi utilizado o método MTT em células Raw (macrófagos de camundongo), de acordo com o descrito por Mosmann (1983).

Nos ensaios de citotoxicidade *in vitro* com o extrato e frações da casca, o extrato etanólico (Figura 15) e a fração EtOAc (Figura 16) não apresentaram toxicidade. Dessa forma, não foi possível calcular a concentração citotóxica (CC₅₀) para as concentrações testadas.

O extrato etanólico demonstrou viabilidade de 91% na concentração de 1,5 μg.mL⁻¹ e viabilidade de 77% na concentração menos diluída (100 μg.mL⁻¹). Na fração EtOAc verificou-se que, principalmente, nas maiores concentrações, houve crescimento celular maior que o do controle. Na concentração de 100 μg.mL⁻¹ observou-se uma viabilidade de 97%, chegando a 100% em 1,5 μg.mL⁻¹. Em nenhuma das concentrações testadas houve diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle.

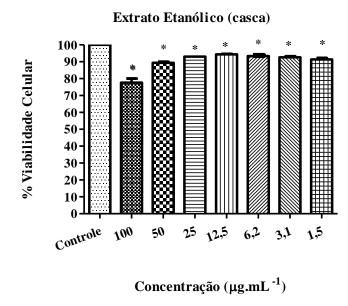


Figura 15: Resultados dos ensaios de citotoxicidade *in vitro* do Extrato etanólico da casca em macrófagos de camundongos pela metodologia MTT. O gráfico mostra a viabilidade celular em diferentes concentrações. Os valores apresentam média e ± desvio padrão do percentual da concentração citotóxica. Diferenças estatisticamente significativas (p<0,05) em relação ao controle são indicados pelo símbolo (*).

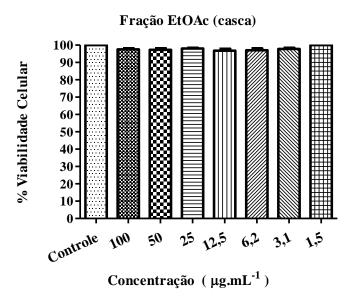


Figura 16: Resultados dos ensaios de citotoxicidade *in vitro* da fração EtOAc da casca em macrófagos de camundongos pela metodologia MTT. O gráfico mostra a viabilidade celular em diferentes concentrações. Os valores apresentam média e ± desvio padrão do percentual da concentração citotóxica. Diferenças estatisticamente significativas (p<0,05) em relação ao controle são indicados pelo símbolo (*).

A fração acetona demonstrou citotoxicidade moderada, principalmente na maior concentração (100 μg.mL⁻¹), com uma viabilidade de 73% em relação ao controle. Apesar de apresentar uma CC₅₀ de 530 μg.mL⁻¹ (Figura 17), nas menores concentrações (6,2; 3,1 e 1,5 μg.mL⁻¹) observou-se uma viabilidade significativa de 93, 95 e 98%, respectivamente. Com exceção das concentrações de 3,1 e 1,5 μg.mL⁻¹, houve diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle.

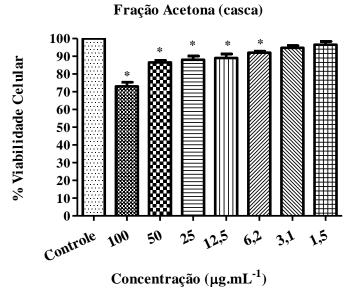


Figura 17: Resultados dos ensaios de citotoxicidade *in vitro* da Fração Acetona da casca em macrófagos de camundongos pela metodologia MTT. O gráfico mostra a viabilidade celular em diferentes concentrações. Os valores apresentam média e ± desvio padrão do percentual de concentração citotóxica. Diferenças estatisticamente significativas (p<0,05) em relação ao controle são indica pelo símbolo (*).

4.3.2 Compostos do Ouriço

Nos ensaios de citotoxicidade *in vitro* com o extrato etanólico do ouriço (Figura 18), todas as concentrações apresentaram diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle. A viabilidade foi de 87 a 91% nas concentrações entre 50 a 1,5 μg.mL⁻¹, respectivamente.

A fração EtOAc, nas concentrações de 12,5; 6,2; 3,1 e 1,5 μg.mL⁻¹, demonstrou viabilidade de 90, 91, 92 e 89%, respectivamente. As três maiores concentrações (Figura 19)

tiveram diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle (p>0,05). A concentração citotóxica (CC_{50}) observado neste composto foi de 880 μ g.mL⁻¹.

A fração acetona (Figura 20) mostrou-se menos citotóxico nas concentrações mais diluídas, 12,5; 6,2; 3,1; 1,5 μ g.mL⁻¹, apresentando uma viabilidade de 85, 89, 88 e 84%, respectivamente.

Extrato Etanólico (ouriço)

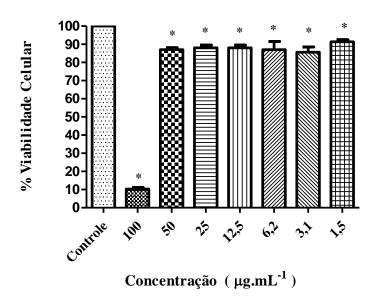


Figura 18: Resultados dos ensaios de citotoxicidade *in vitro* do Extrato etanólico do ouriço em macrófagos de camundongos pela metodologia MTT. O gráfico mostra a viabilidade celular em diferentes concentrações. Os valores apresentam média e ± desvio padrão do percentual de concentração citotóxica. Diferenças estatisticamente significativas (p<0,05) em relação ao controle são indicados pelo símbolo (*).

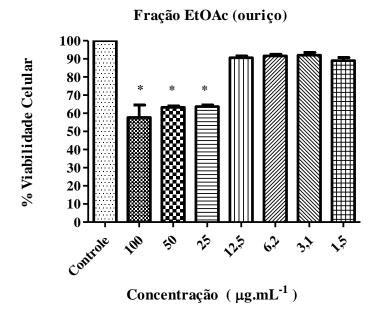


Figura 19: Resultados dos ensaios de citotoxicidade *in vitro* da Fração EtOAc do ouriço em macrófagos de camundongos pela metodologia MTT. O gráfico mostra a viabilidade celular em diferentes concentrações. Os valores apresentam média e ± desvio padrão do percentual de concentração citotóxica. Diferenças estatisticamente significativas (p<0,05) em relação ao controle são indicados pelo símbolo (*).

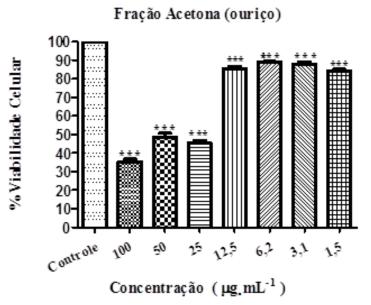


Figura 20 Resultados dos ensaios de citotoxicidade *in vitro* da Fração Acetona do ouriço em macrófagos de camundongos pela metodologia MTT. O gráfico mostra a viabilidade celular em diferentes concentrações. Os valores apresentam média e ± desvio padrão do percentual de concentração citotóxica. Diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle são indicadas pelo símbolo (***).

O teste de citotoxicidade pelo método MTT, consiste em medir indiretamente a viabilidade celular pela atividade enzimática mitocondrial das células vivas, inclusive de macrófagos colocados com extratos, frações e substâncias puras obtidas de espécies vegetais; e vem sendo utilizados em diversos experimentos, devido sua especificidade e não toxidez; (AUTORE et al, 2001; LIMA et al, 2006)

Foi observado nos compostos da casca, nas menores concentrações, um crescimento igual às células que não receberam tratamento (controle). Nas maiores concentrações houve um crescimento celular acima do crescimento do grupo controle, principalmente na fração EtOAc. Esse resultado intrínseco necessita de teste mais específicos, para a comprovação, de uma possível estimulação no crescimento celular por parte da planta.

A integridade do sistema imunológico é essencial na defesa frente à micro-organismos infecciosos e seus produtos tóxicos. Dessa forma, um composto capaz de estimular o crescimento de células, principalmente do sistema imune, como os macrófagos, pode ser uma alternativa no tratamento de muitas doenças (CORRÊA et al, 2006).

Em respostas pró-inflamatórias, os macrófagos sofrem processo de ativação, caracterizados por rápido aumento no metabolismo, motilidade e atividade fagocítica. Secretam mais de 100 produtos, dentre eles espécies reativas de oxigênio (EROs), que estão relacionadas com diversas respostas fisiológicas, desde a proliferação celular até o apoptose. Em respostas ativas há um aumento de 2-20 vezes o consumo de O₂ e o aumento do metabolismo da glicose dependendo da célula e da natureza do estímulo (PARSLOW et al, 2000).

Um dos produtos da EROs é o peróxido de hidrogênio, que atua como molécula sinalizadora e é um agente citotóxico no sistema de defesa, podendo também causar doenças. O óxido nítrico, outra EROs, quando estimulados, regula o sistema imune e participando como um dos primeiros combatentes na defesa do organismo, com poder microbicida (FLORA Filho e ZILBERSTEIN, 2000; FORMAN e TORRES, 2001).

A literatura relata a capacidade que algumas plantas possuem em estimular células do sistema imunológico, como *Tinospora cordifolia* (MATHEW e KUTTAN, 1997), *Withania somnifera* (DAVIS e KUTTAN, 2000). No estudo realizado com o fitoterápico conhecido como "Mais Vida", que é uma mistura de sete plantas, verificou-se a produção de ânions superóxidos, que estão associados aos mecanismos de defesa do organismo (CORRÊA et al., 2006; FRANÇA et al., 2010).

Um fator a ser acrescentado é a quantidade de selênio presente na castanha-do-pará, principalmente na forma se selenimetionina. Esse mineral tem sido alvo de estudos, pois protege contra ação nociva de metais pesados (atividade antioxidante) e aumento da resistência do sistema imunológico (KANNAMKUMARATH et al, 2002; GIORDANO, 2009).

No presente trabalho, o índice de seletividade (IS), foi obtido a partir de testes *in vitro* de modo a comparar a dose que mata 50% das células (macrófagos) com a toxicidade dos compostos frente a cepa 3D7, *P. falciparum*, correlacionando a toxicidade dos compostos e a concentração inibitória contra *P. falciparum*.

Considera-se uma droga segura e promissora, quando o índice de seletividade (IS) é igual ou maior que 10, podendo ser considerada tóxica quando esse índice é menor que 10 (CARDONA et al, 2006).

Como já evidenciado, os compostos que demonstraram CC₅₀ foi a fração acetona da casca (530 µg.mL⁻¹) e a fração EtOAc do ouriço (880 µg.mL⁻¹), portanto, os compostos que tiveram seus IS calculados. Estes dois compostos foram considerados 33 e 13,97 vezes, menos citotóxicos para macrófagos que para o *P. falciparum*, respectivamente.

Diante dos resultados apresentados, há a necessidade de testes mais específicos para validar com segurança que esses compostos não são realmente tóxicos, uma vez que esse teste não é o único padrão decisório na comprovação de eficácia de um composto.

De acordo com o Protocolo do National Cancer Institute (NCI) extratos brutos de origem vegetal só podem ser considerados significativos, ou seja, só podem ser considerados tóxicos se os valores de $CI_{50} \leq 30~\mu g.mL^{-1}$. Assim como devem ser considerados significativos valores de $CI_{50} \leq$ de 4 $\mu g.mL^{-1}$ para substância puras (SUFFNESS e PEZZUTO, 1990). Comparando-se os resultados aceitos como significativos e os resultados encontrados no teste de viabilidade celular, nenhum dos compostos aproximou-se desses valores, demonstrando que os compostos não se mostraram tóxicos frente aos macrófagos de acordo com esse protocolo.

Como já descrito, os macrófagos quando estimulados geram as EROs, como o óxido nítrico, que em altas concentrações é tóxico aos agentes invasores, existindo um tênue limite de concentração tissular entre a não toxicidade às células hospedeiras e a toxicidade necessária para a ação microbicida, podendo ser essa ativação a toxidez evidenciada que o índice de seletividade apresentou (FLORA Filho e ZILBERSTEIN, 2000).

Compostos bioativos podem ser tóxicos em altas concentrações. O quinino, antimalárico comprovado cientificamente e muito utilizado usualmente, apresenta toxicidade.

Sua utilização contínua e prolongada é desafiada pela baixa tolerabilidade e baixa adesão com regimes posológicos. Devido seus efeitos colaterais, é considerada uma droga de janela terapêutica estreita, porém é utilizada há mais de 400 anos (ACHAN et al, 2011; CRAMER et al, 2011).

A cloroquina, apesar de ser um dos antimaláricos menos tóxicos, também pode apresentar toxidade. Sendo um composto altamente lipofílico, acumula-se nos tecidos e sua meia-vida de 3-6 dias nos humanos pode elevar sua distribuição e elevar seu volume de distribuição. Assim, pode causar efeitos adversos (toxicidade ocular) devido à alta concentração de fármacos nos tecidos (O'NEIL et al, 1998).

4.4 ATIVIDADE in vivo

O extrato etanólico e as frações da casca foram selecionados para realização do teste *in vivo*. Estes testes foram realizados com *P. berguei*, devido seu desenvolvimento clínico, patológicos e imunológicos serem equivalentes ao manifestado nos humanos (LAMB et al, 2006).

Com exceção da fração acetona que foi testada na dosagem de 250 mg/kg/dia, o extrato etanólico e a fração EtOAc foram testados em duas dosagens, 250 e 500 mg/kg/dia. As leituras das lâminas foram realizadas no 5° e 7° dias.

Na dosagem de 250 mg/kg/dia, extrato etanólico e frações apresentaram uma baixa atividade no 5º dia, apresentando uma média de redução de 1,65% (Figura 21). No entanto, no 7º dia o extrato etanólico e a fração acetona, apresentaram uma média de redução significativa, 33 e 32,5%, respectivamente (Tabela 5). Segundo Carvalho, et al (1991) um composto é considerado ativo quando a redução de parasitemia é maior ou igual a 30%, sendo os resultados apresentados como ativos.

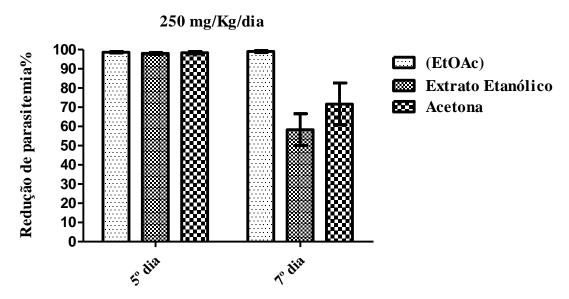


Figura 21 Gráfico de redução de parasitemia dos compostos, EtOAc, extrato etanólico da casca e acetona na dose de 250 mg/kg/dia administrada via oral (gavage) após cálculo de erro padrão dos 2 experimentos.

Na dosagem com 500 mg/kg/dia, o extrato etanólico e a fração EtOAc demonstraram uma boa atividade, com redução no 5° dia de 16,3 e 29,7 (1° experimento) e 20 e 24,3% (2° experimento). No 7° dia houve uma significativa redução da parasitemia, chegando a inibir 99,5 e 100% (1° experimento) e 99,27 e 76% (2° experimento), com média de redução de 99,3 e 88%, respectivamente (Tabela 5; Figura 22).

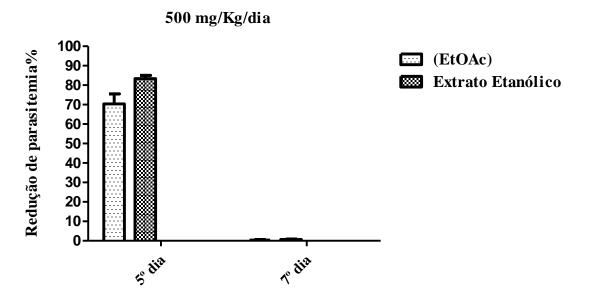


Figura 22 Redução da parasitemia da fração EtOAc e do extrato etanólico da casca na dose de 500 mg/kg/dia administrada via oral (gavage) após cálculo de erro padrão dos 2 experimentos.

Tabela 5 Supressão da parasitemia em animais infectados com *P. berghei* e redução geral com erro padrão calculado após a realização dos testes (n=2). Tratamento oral (250 e 500 mg/kg/dia) com extrato etanólico e frações EtOAc e Acetona da casca.

Composto	Dose mg/kg/dia	Experimento 1 %		1		Redução Geral após Calculo do Erro padrão* %	
		5ª dia	7ª dia	5ª dia	7ª dia	5ª dia	7ª dia
EEC	250	2	41,7	1,3	25	1,65	33
EtOAc	250	1,4	1	2,4	1	1,7	1
Acetona	250	1	50,5	2	15	1,5	32,5
EEC	500	16,3	99,5	20	99,27	17,5	99,3
EtOAc	500	29,7	100	24,3	76	24,5	88

Legenda: EEC (extrato etanólico da casca), EtoAc (Acetato de etila).

Tabela 6: Média de sobrevida ± desvio padrão após a realização dos experimentos.

Composto	Dose mg/kg/dia	Experimento 1	Experimento 2	
Extrato Etánolico	250	28±2	29±1	
	500	30±0	26±4	
EtOAc	250	27±3	27±3	
	500	30±0	26±4	
Acetona	250	28±2	26±4	
Cloroquina	5	26±4	26±4	
Controle	*	27±3	28±2	

^{*200} µl Tween 20-2%

No geral, observou-se que nos dois experimentos os animais que foram tratados com os extratos e frações da casca da *B. excelsa*, têm uma média de sobrevida maior do que o grupo controle e maior que o grupo da cloroquina (tabela 6).

Em trabalho realizado por Gama (2013), foi observado que o pré-tratamento com o fruto da *B. excelsa* com camundongos infectados com *P. berguei*, tiveram efeitos significativos em relação a alguns parâmetros, como aumento de média de sobrevida, diminuição da parasitemia e leucócitos totais. A redução da parasitemia com esse pré-tratamento foi de cerca de 37,5% em relação ao grupo controle.

Tendo em vista os transtornos e prejuízos, sociais e econômicos causados pela malária, faz-se importante a busca e investigação no conhecimento tradicional do uso de plantas antimaláricas para sua comprovação como modelos bioativos, objetivando isolar, purificar, estabilizar extratos e no desenvolvimento de fitoterápicos (BRANDÃO et al, 1985).

Diversas plantas de origem vegetal e do conhecimento tradicional têm sido comprovadas cientificamente, como a *Bidens pilosa*, que é uma planta bastante utilizada no Brasil para tratar febre e malária (BRANDÃO et al, 1997; ANDRADE et al, 2004).

Em investigação de três plantas do cerrado utilizadas como antimaláricos - *Vanillosmopsis arbórea* (Asteracea), *Lippia sidoides* (Verbanaceae) e *Croton zehntneri* (Euphorbiaceae), Mota, et al (2012) observou atividade antimalárica em camundongos infectados com a forma *P. berguei*. Assim como Carvalho e Krettli (1991) que testaram diferentes tipos de plantas, e comprovaram a bioatividade de algumas, como as *Esenbeckia*

febrtfiiga. (Rutaceae), Lisianthus speciosus (Gentianaceae), Acanthospermum australe (Compositae) e Tachia guyanensis (Gentianaceae).

No presente trabalho a *B. excelsa*, mostrou-se ativa contra as formas *P. falciparum* e *P. berguei*, não sendo considerada tóxica, mostrando-se como uma promissora fonte de estudos, apresentando ainda um grande potencial bioativo.

CONCLUSÃO

- 1. Os compostos da casca demonstraram bioatividade significativa contra formas de *P. falciparum* cepa 3D7 (*in vitro*) e *P. berguei* (*in vivo*);
- 2. Os compostos não apresentaram toxicidade significativa, revelando um efeito de crescimento celular significativo nos macrófagos.
- 3. Os resultados *in vivo* demonstraram uma atividade significativa para os extrato etanólico e EtOAc na dose de 500mg/kg.
- 4. A *Bertholletia excelsa* demonstrou bons resultados que merecem sua continuação no seu isolamento, purificação e na confirmação de ser um promissor antimalárico.

PESPECTIVAS FUTURAS

- Isolar e identificar as principais substâncias para identificar possíveis compostos do metabolismo secundários com atividade;
- Realizar outros ensaios específicos de citotoxicidade *in vivo* e *in vitro*, com outras células, para validar os resultados de toxidade;
- Verificar a viabilidade dos macrófagos e quantificar a produção de espécies reativas do oxigênio para identificar seu efeito no o sistema imunológico.
- Realizar o teste in vivo com os compostos isolados contra o para validar os resultados do teste in vitro e in vivo.
- Contribuir na elucidação de uma molécula eficaz e de baixo custo para melhorar a vida daqueles que sofrem com a malária.

6 REFERÊNCIAS

ACHAN, J.; TALISUNA, A.O.; ERHART, A.; YEKA, A.; TIBENDERANA, J.K.; BALIRAINE, F.N.; ROSENTHAL, P.J.; D'ALESSANDRO, U. Quinine, an old antimalarial drug in a modern world: role in the treatment of malaria. **Malaria Journal**, v. 10, p. 144-156, 2011.

ALBRECHT, L. Análise do Repertório de Genes Variantes de *Plasmodium falciparum* da Amazônia e Identificação de Genes Variantes Relacionados ao Fenótipo de Citoaderência a ICAM1 de Isolados de Rondônia. Tese (Doutorado em Ciências). Instituto de Ciências Biomédica da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2008.

ANDRADE Neto, V.F.A.; GOULART, M.O.F.; SILVA-Filho, J.F.; SILVA, M.J.; PINTO, M.C.F.R.; PINTO, A.V.; ZALIS, M.G.; CARVALHO, L.H.; KRETTLI, A. U. Antimalarial activity of phenazines from lapachol, B-lapachone and its derivatives against *Plasmodium falciparum in vitro* and *Plasmodium berghei in vivo*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letter**, v. 14, p. 1145-1149, 2004.

ANDRADE Neto, V.F. A.; POHLIT, A. M. PINTO, A. C. S.; SILVA, E. C. C..; NOGUEIRA, K. L.; MELO, M. R. S.; HENRIQUE, M. C.; AMORIM, R. C. N.; SILVA, L. F. R.; COSTA, M. R. F.; NUNOMURA, R. C. S.; NUNOMURA, S. M.; ALECRIM, W. D.; ALECRIM, M. G. C.; CHAVES, F. C. M. e VIEIRA, P. P. R. *In vitro* inhibition of *Plasmodium falciparum* by substances isolated from Amazonian antimalarial plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz,** v.102, n. 3, p. 359 -365, 2007.

ANDRADE-Neto, V.F.A.; BRANDÃO, M.G.L.; STEHMANN, J.R.; OLIVEIRA,L.A. e KRETTLI, A.U. Antimalarial activity of Cinchona-like plants used to treat fever and malaria in Brazil. J. **Ethnopharmacology**, v. 87, p. 253-256, 2003.

ARAÚJO, A. P.; JORDY Filho, S; FONSECA, W. N. A vegetação da Amazônia brasileira. In: SIMPÓSIO DO TRÓPICO ÚMIDO, I, 1984, Belém. **Anais...** Belém: EMBRAPA-CPATU, p.135-144, v. 2, 1984.

AUTORE, G.; RASTRELLI, L.; LAURO, M.R.; MARZOCCO, S; SORRENTINO, R.; SORRENTINO, U.; PINTO, A.; AQUINO, R. Inhibition of nitric oxide synthase expression by a methonolic extract of *Crescentia alata* andaits derived flavonols. **Life Sciense, Elmsford**, v. 70, p. 523-534, 2001.

BACCHI, E.M. **Controle de qualidade de fitoterápicos**. In: DI STASI, L.C.(org.). Plantas medicinais: arte e ciências. São Paulo: Universidade Estadual Paulista, p. 169-197, 1996.

BARATA, R. C. B. Malaria in Brazil: Trends in the Last Ten Years. Caderno de Saúde Público, Rio de Janeiro, v. 11 (1), p.128-136, Jan/Mar, 1995.

BEUTLER, B.; GREENWALD, D.; HULMES, J. D.; CHANG,M.; PAN,Y.C.E.; MATHISON, J.; ULEVITCH, R. and CERAMI, A. Identity of tumor necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachection. **Nature**, v. 316, p. 552-554, 1985.

BÉZIVIN, C.; TOMASI, F.; LOHÉZIE-LE, D.; BOUSTIE, J. Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer cell lines. **Phytomedicine**.; v.10, p. 499-503, 2003.

BRADLEY, D. J. Malaria-whence and whiter? In Malaria: waiting for the vaccine. **Targett GAT**, John Willey & Sons Ltd: Chichester, West Sussex, Inglaterra, 1991.

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

BRANDÃO, M.G.L.; KRETTLI, A.U.; SOARES, L.S.R.; NERY, C.G.C.; MARINUZZI, H.C. Antimalarial activity of extracts and fractions from *Bidens pilosa* and other *Bidens* species (Asteraceae) correlated with the presence of acetylene and flavonoid compounds. **Journal Ethnopharmacology,** v. 57, p 131-138, 1997.

BRASIL. Decreto nº 51.209, de 18/08/1961. **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 Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Projeto de Monitoramento** da Castanha do Brasil. Relatório de Atividades. Brasília/DF, 2002. p.110.

BRASIL. Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde. **Manual de terapêutica da malária**. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/funasa/manu_terapeutica_malaria.pdf. Acesso em: 12 dez. 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. **Situação Epidemiológica da Malária no Brasil, 2008**. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/folder_malaria_2008_final.pdf. Acesso em: 02 nov. 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Ações de controle da malária: manual para profissionais de saúde na atenção básica**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 52 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Programa Nacional de Prevenção e Controle da Malária PNCM**, 2003.

BULL, P. C. E MARSH, K. The role of antibodies to *Plasmodium falciparum*-infected-erythrocyte surface antigens in naturally acquired immunity malaria. **Trends Mibrobiology**, v. 10, n. 2, Feb, p. 55-8. 2002.

CALOMME, M.L.; PETERS, A.; VLIETNINCK, D.; VANDEN, B.D. Inhibition of bacterial mutagenesis by *Citrus* flavonoids. **Planta Médica**, v.62, p 222-226

CAMARGO, E. P. A malária encenada no grande teatro social. **Estudos avançados,** v. 9, n. 24. São Paulo May/Aug, 1995.

CAMARGO, E. P. Malária, maleita, paludismo. **Ciência e Cultura**, v. 55 n. 1. São Paulo, Jan/Mar 2003.

CAMPOS, F. R.; JANUÁRIO, A. H.; ROSAS, L. V.; NASCIMENTO, S. K. R.; PEREIRA, P. S.; FRANÇA, S.C.; CORDEIRO, M. S. C.; TOLDO, M. A.; ALBUQUERQUE, T. S. Trypanocidal activity of extracts and fractions of *Bertholletia excelsa*. **Fitoterapia**, v. 76, 26–29, 2005.

CAMPOS, M.B.; COSTA, A.L.P.; BARBOSA, L.P.J.L.; HENRIQUE, F. Phytochemistry and qualitative analysis of antimicrobial activity of bark hydroalcoholic tincture of *Bertholletia excelsa* Humb. & Bomple (Lecytidaceae) against to gram-negative microorganisms. **Ciência Equatorial**, v. 1, n 2 - 2° Semestre 2011.

CARDONA, W.; QUINONES W.; ROBLEDO, S.; VELEZ, I.; MURGA, J.; GARCIA-Fortanet, J.; CARDA, M.; CARDONA, D.; ECHEVERRI, F. Antiparasite and antimycobacterial activity of passifloricin analogues. **Tetrahedron**, v. 62, p. 4086-4092, 2006.

CARDOSO, I. N. **Plantas tóxicas no perímetro urbano de Caxias, no Maranhão**. Monografia apresentada ao curso de especialização em Educação Ambiental, CESC-UEMA, 2004.

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

CARVALHO, L.H.; KRETTLI, A.U. Antimalarial chemotherapy with natural products and chemically defined molecules. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 86 (Suppl. II), p. 181-184, 1991.

CECHINEL Filho, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n 99, 1998.

CORRÊA, V.S.C.; MAYNIÊ, J.C.; FRANÇA, E.L.; HONÓRIO-França, A.C. Atividade funcional de fagócitos na presença do fitoterápico "Mais Vida". **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 8, n 2, p. 26-32, Botucatu-SP, 2006.

COSTA A.L.P.; CAMPOS, M.B.; BARBOSA, L.P.L.; MESSIAS R. Preliminary phytochemical and qualitative analysis of antimicrobial activity of bark hydroalcoholic tincture of *Bertholletia excelsa* Humb. & Bomple (Lecytidaceae) against to gram-positive microorganisms. **Ciência Equatorial**, v. 2, n 1 - 1° Semestre 2012.

COUTO, A. A.; CALOSA, V. S.; SANTOS, M. A.; SOUZA, J. M. Resistência *in vitro* de cepas do *Plasmodium falciparum* isolados no Sul do Estado do Pará, em diferentes períodos: emergência de casos de multi-resistência. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical,** v.26, n.1, p. 5-9, Jan-Mar, 1993.

CRAMER, J.P.; LÓPEZ-Vélez, R.; GERD D Burchard, G.D.; GROBUSCH, M.P.; DE VRIES, P.J. Treatment of imported severe malaria with artesunate instead of quinine- more evidence needed? **Malaria Journal**, v.10, p.256-258, 2011.

COX-Singh, J.; SINGH, B. *Knowlesi* malaria: newly emergent and of public health importance? **Trends in Parasitology,** v. 24, n. 9, p. 406-10, 2008.

CUNICO, W.; CARVALHO, S.A.; GOMES, C.R.B.G.H. Antimalarials drugs - history and new approaches. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.89, n.1, p.49-55, 2008.

DAVIS, L.; KUTTAN, G. Immunomodulatory activity of *Withania somnifera*. **Journal of Ethonopharmacology**, v. 71, n 1-2, p. 193-200, 2000.

DEANE, L.M. Malaria Vectors on Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.81, n.2a., p.5-14, 1986.

Di SANTI, S.M.; NEVES, V.L.F.C.; BOULOS, M.; DUTRA A.P.; RAMOS, A.M.S.V.; SANTOS, M.; BARATA, L.C.B. Avaliação da resposta do *Plasmodium falciparum* à cloroquina, quinino e mefloquina. **Revista Instituto Medicina Tropical**, v.30, n.3, p.147-152, Maio-Junho, São Paulo, 1988.

DUCKER, A.; G. A. BLACK. Notas sobre a fitogeografia da Amazônia brasileira. **Boletim Técnico do Instituto Agronômico do Norte**, v.29, p.1-48, 1954.

ENSERINK, M. Global public health. What's next for disease eradication? **Science**, v.330, p.1736-1739, 2010.

FARID, M.A. The malaria programme-from euphoria to anarchy. **World Health Forum** v.1, p.8-33, 1980.

FERREIRA, M.C. Medicinal knowlege and plant utilization in an Amazonian coastal community of Marudá, Pará State (Brasil). **Journal of Ethnhopharmacology**, v.126, p. 159-175, 2009.

FERREIRA, P.; Agência Fiocruz de Notícia – Saúde e Ciências para todos, 2006. Disponível em URL: http://www.fiocruz.br/. Acesso: em 18 agos. 2010.

FLORA FILHO, R. ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v.46, n.3, p.265-271, 2000.

FONSECA, Z. A. **Pantamed** – **plantas e ervas medicinais e fitoterápicos**.. Disponível em: http://plantamed.com.br/plantaservas/espécies/Bertholletia_excelsa.htm Acesso em: 10 dez de 2009.

FORMAN, H. J.; TORRES, M. Redox signaling in macrophages. **Molecular Aspects of Medicine**, **Elmsford**, v.22, p.189-216, 2001.

FORMICA, J.L.; REGELSON, W. Review of the biology of Quercetin and related bioflanonoids. **Food and chemical Toxicology**, v.33(12), p 1061-80, 1995.

FRANÇA, E.L. et al. Immunomodulatory effects of herbal plants plu melatonina on human blood phagocytes. **International Journal of Phytpmedicine,** v. 2, p. 354-162, 2010.

FRANÇA, T.C.C.; SANTOS, M.G.; VILLAR, J. D.F. Malaria: historical aspects and chemoterapy. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1271-1278, São Paulo, 2008.

FRANCO I. V., FONTANA V. L. **Ervas & Plantas: A Medicina dos Simples.** 9ª Ed.. Livraria Vida Ltda: Erexim – RS, p. 208, 2004.

FRATUS, A.S.B. Expressão e Reconhecimento Imune de Alelos Conservados de Antígenos Variantes de *Plasmodium falciparum*. Dissertação (Mestre em Ciências), Instituto de Ciências Biomédica da Universidade de São Paulo, 2008.

GAMA, L. M. **Malária e medicina popular:** efeito da *Bertholletia excelsa* H.B.K. (Castanha-do-Pará) em camundongos infectados com *Plasmodium berghei*. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Belém, 2013. 63 p.

GEN, X.P.; LIN, F.S. Traditional antiparasitic drugs in Chine. **Parasitology Today**, v.2, p.353-35.

GIORDANO, B. N. E.; Efeito do ozônio sobre a micloflora e aflotoxinas durante a armazenagem de castanhas-do-Brasil com casca (*Bertholletia excelsa H.B.K.*). Tese (Mestre em Ciências dos Alimentos), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis/SC, 2009.

GREENWOOD, B.; MUTABINGWA, T. Malaria in 2002. **Nature**, v.415, n.6872, p.670-2, fev. 2002.

HARRISON, Mark. **Health for all? Affluence, poverty and disease since 1945**. In: _____. Disease and modern world 1500 to the present day. London: Polity Press, 2005.

KANNAMKUMARATH, S.S.; WROBEL,K.; CARUSO, J.A. HPLC-ICP-MS determination of selenium distribution and speciation in different types of nut. Anal. **Bioanalytical Chemical**, v.373, p.454-460, 2002.

KIRCHGATTER, K. Análise de seqüência var de populações naturais de *Plasmodium* falciparum da Amazônia Brasileira. Tese (Doutorado em Ciências), Instituto de Ciências Biomédica da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2001.

KLAYMAN, D.L.; Qinghaosu, no antimalarial from China. Science, v. 228, p.1049-55, 1985.

KRETTLI, A.U. Great Endemic Diseases in Brazil. **Gazeta Médica da Bahia**, Centro de Pesquisas René Rachou, Fiocruz; Belo Horizonte, MG, Brasil.; (Suplemento 1), p.74-78, 2008.

LADISLAU, J.L.B.; LEAL,M.C.; TAUIL, P.L. Evaluation of the Plan for Intensification of Malaria Control Actions in the Brazilian Amazon region, based on a descentralization process. **Epidemiologia e Serviço da Saúde** v.15, n.2 Brasília jun. 2006.

LAMB, T. J.; BROWN, D.E.; POTOCNICK, A.J. LANGHOURNE, J. Insights into the immunopathogenesis of malaria using mouse models. **Expert review in molecular medicine**, v.24, n.8, 2006.

LIMA, A.P.; PEREIRA, R.T.; VILANOVA-Costa, C.A.S.T.; RIBEIRO, A.S.B.B.; SILVEIRA-Lacerda, E.P. Avaliação da atividade antitumoral e citotóxica da planta *Siolmatra brasiliensis*. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3 (2), p 10-12, 2006.

LITSIOS, S. Lucha antipalúdica y servicios epidemiológicos: ¿ Hacia una nueva orientación? **Foro Mundial de la Salud**, v. 14, p. 45-54,1993.

LORENZI, H.; MATOS F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2ª ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2008.

LUNA Filho, A.L.R. Sistema especialista para telediagnóstico da malária no ambiente Web Servicies – WST Web Services Telediagnosis. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Eletricidade), Universidade Federal do Maranhão, Maranhão - MA 2005.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A.C.; VEIGA Jr., V. F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429- 438, 2002.

MARQUES, A.C. Situação Epidemiológica da Malária no Brasil. **2º Congresso Brasileiro de Epidemiologia**. Belo Horizonte: Abrasco, 1992.

MATHEW, S.; KUTTAN, G. Antioxidant activity of *Tinospora cordifolia* and its usefulness in the amelioration of cyclophosphamide-induced toxicity. **Journal of Experimental and Clinical Cancer Research**, v. 16, p.407-411, 1997.

MELLO, D. A. Malária entre populações indígenas do Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 1 n.1. Rio de Janeiro. Jan/Mar. 1985.

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

MERCK, E. Reactivo de coloración para cromatografía em capa fina y em papel. **Darmstaadt**, Alemanha, 1972.

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

MOTA, M. L.; LOBO, L.T.C.; COSTA, J.G.M.; COSTA, L.S.; ROCHA, H.A.O.; SILVA, L.F.R.; POHLIT, A.M.; ANDRADE-Neto, V.F. *In Vitro* and *In Vivo* Antimalarial Activity of Essential Oils and Chemical Components from Three Medicinal Plants Found in Northeastern Brazil. **Planta Med**, Georg Thieme Verlag KG Stuttgart, 2012.

NAOZUCA, J. Especiação química elementar em castanha-do-pará, coco e cupuaçu. Tese (Doutorado em Química Analítica), Instituto de Química da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

NEVES, D. P. et al. **Parasitologia humana**. 11ª ed. Editora Atheneu – São Paulo, 2005.

NORONHA, E.; ALECRIM, M. G.; ROMERO, G. A. S.; MACEDO, V. RIII mefloquina resistance in children with *falciparum* malaria in Manaus, AM, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.33, n.2, Uberaba Março/Abril 2000.

NUNES Medina, R. **História da campanha de erradicação da malária na década de 50 no Brasil:** uma contribuição para o estudo do modelo campanhista. Dissertação (Mestrado em Saúde Coletiva) - Universidade Estadual do Rio de Janeiro, Instituto de Medicina Social, Rio de Janeiro, p. 70, 1988.

OMS. Nota descritiva nº 94. Março de 2013. Disponível em: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/es/index.html. Acesso em fevereiro de 2013.

O'NEILL, P. M. et al4-aminoquinolines-past, present, and future: a chemical perspective. **Pharmacology Therapy**, v. 77, n. 1, p. 29 – 58, 1998.

PACHECO, A.M. Selênio e aflatoxinas em castanhas-do-Brasil (Bertolletia excelsa H.B.K.) e qualidades de produtos derivados. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos), Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Florianópolis, 2007.

PARSLOW, T.G.; BAINTON, D.F. Imunidade Inata. In STITES, D.P.; TERR, A.I.; PARSLOW, T.G. Imunologia médica, 9° ed., cap. 2, p. 19-32, Rio de Janeiro, Guanabara-Koogan, 2000.

PIMENTEL, L.F.; JÁCOME, A.T.J.; MOSQUEIRA, V.C.F.; SANTOS-Magalhães, N.S. Application of pharmaceutical nanotechnology to the treatment of malaria. **Revista Brasileira de Ciências e Farmacêuticos**, v.43, n.4, São Paulo, Oct/Dec. 2007.

PINTO, E.P. Rondônia, evolução histórica: criação do Território Federal de Guaporé, fator de integração nacional. Rio de Janeiro: Expressão e cultura, 1993.

PINTO, L. N. Plantas medicinais utilizadas em comunidades no município de Iguarapé-Mirim – PA – Etnofarmácia do município de Iguarapé-Mirim –PA. Dissertação (Ciências farmacêuticas), Universidade Federal do Pará, 2008. PLOWE, C.V. Antimalarial drugs resistance in Africa: strategies for monitoring and deterrence. **Curr Top Microbiology Immunology**, 2005.

PRINCE, R. Artemisinin drugs: novel antimalarial agents. **Expert Opinion Investigation Drugs.**

REY, L.; **Parasitologia**. Ed Guanabara Koogan, 3ª ed., Rio de Janeiro, 2001.

RODRIGUES, M.J.E. Derivação de sulfonamidas e 8-aminoquinolinas como possível alternativa terapêutica no combate à malária. Tese (Mestrado em Química), Universidade do Porto, 2003.

SANTOS, J. U. M.; BASTOS, M. N. C.; GURGEL, E. S. C.; CARVALHO, A. C. M.; *Bertholletia excelsa* Humboldt & Bonpland (Lecythidaceae): aspectos morfológicos do fruto, da semente e da plântula. Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi, **Ciências Naturais**, Belém, v. 1, n. 2, p. 103-112, maio-ago. 2006.

SCHOTTELIUS, J.; GILBERGER, T.; EHRHARDT, S.; BURCHARD, G. *Plasmodium knowlesi*: cause of naturally acquired malaria in humans. **Dtsch. Med. Wochenschr.** Feb; v. 135, n.7, p. 297-300. Alemanha, 2010.

SIANI, A.C.; MICHILES, E. Medicamentos de Origem Vegetal: Cenário atual de desenvolvimento, produção e mercado. **Fármacos e Medicamentos**. n. 37, ano VI, p. 14-18, 2005.

SILVA, R. **Malária e desenvolvimento: a saúde pública no governo JK (1956-1961).** Tese (Doutorado em História das Ciências e da Saúde) — Fundação Oswaldo Cruz, Casa de Oswaldo Cruz, 2008 Rio de Janeiro: s.n., 2008. 274 f.

SILVEIRA, A.C.; REZENDE, D.F. Avaliação da estratégia global de controle integrado da malária no Brasil. Brasília: Organização Pan-Americana da Saúde, 2001. 120p. :il. Disponível em: http://www.livrosgratis.com.br/arquivos_livros/op000014.pdf. Acesso em: 3 abr 2013.

SIMÕES, C. M. O.; *et al* **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Editora da UFRGS/Editora da UFSC. 5ª edição. Porto Alegre/ Florianópolis, 2003.

SOUSA, C.I.C.C. Estudo comparativo da bioatividade in vitro da Bertholletia excelsa em cepas do Plasmodium falciparum com a técnica de microscopia e radiomarcação. Monografia — Fundação Universidade Federal de Rondônia, Departamento de Ciências Biológicas, Porto Velho — 2010.

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

SVS. Sistema de Vigilância em Saúde. **Malária no Brasil.** Disponível em: <portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/be_malaria_01_2005.pdf>. Acesso em: 23 nov. 2012.

TAUIL, P.L. Avaliação de uma a nova estratégia de controle da malária na Amazônia brasileira. Tese (Doutorado em Medicina Tropical), Universidade de Brasília. Brasília, 2002.

TRAGER, W.; JENSEN, J.B. Human malaria parasites in continours culture. **Science**, v.193, n.4254, p.673, ago de 1976.

TUTEJA, R. Malaria – na overview. **The FEBS Journal**, v.47, p.4670-4679, 2007.

VEIGA Jr., V.F.; PINTO A.C.; MACIEL, M.A.M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v.28, n.3, p.519-528, 2005.

VERONEZI, R. **Doenças Infecciosas e Parasitárias**. Editora Guanabara-Koogan 7^a ed., Rio de Janeiro, 1983.

WHITE, N.J. *Plasmodium knowlesi:* the fifth human malaria parasite. **Clinical Infectious Disease**, v.46, n.2, p.172, jan de 2007.

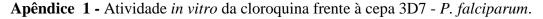
WONGSRICHANALAI, C.; PICKARD, A.L.; WERNSDORFER, W.H.; MESHNICK, S.R.O. Epidemiology of drug-resistant malaria. **Lancet Infectious Disease**, Amsterdam, v.2, p. 209-218, 2002.

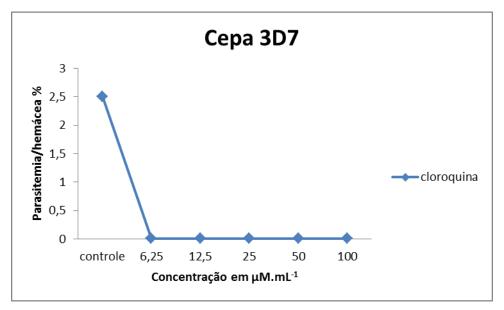
YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; CECHINEL Filho, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, v. 24, n. 1, 2001.

ZALIS, M.G.; WILSON, C.M.; ZHANG, Y.; WIRTH, D.F. Characterization of the Pfmdr2 gene for *Plasmodium falciparum*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, n. 62, p. 83-92, 1993.

ZUANAZZI, J.A.C.; MONTANHA, J.A. Flavonoides. In: Simões C.M.M.O. et al. (org) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ªed. Porto Alegre: UFRGS, p.577- 614.

APÊNDICE





Apêndice 2 Resultado dos ensaios *in vitro* do Extrato etanólico da casca da *B. excelsa* frente à cepa 3D7 – *Plasmodium falciparum*. A tabela mostra a viabilidade dos compostos em diferentes concentrações. Os valores apresentam média e ± desvio padrão do percentual de inibição de crescimento do parasito. Diferenças estatisticamente significativas (p< 0,05) em relação ao controle são indicados pelo símbolo (*).

Concentração	Bioatividade * ± DP	Parasitemia (%)
100 μg.mL ⁻¹	83±0,7	17**
$50 \mu g.mL^{-1}$	79±0,7	21
25 μg.mL ⁻¹	74±1,4	26
12,5 μg.mL ⁻¹	55±0,7	45
6,25 μg.mL ⁻¹	47±0,7	57

Apêndice 3 Resultado dos ensaios *in vitro* da fração Éter de Petróleo da casca da *B. excelsa* frente à cepa 3D7 – *Plasmodium falciparum*. A tabela mostra a viabilidade dos compostos em diferentes concentrações. Os valores apresentam média e ± desvio padrão do percentual de inibição de crescimento do parasito. Diferenças estatisticamente significativas (p< 0,05) em relação ao controle são indicados pelo símbolo (*).

Concentração	Bioatividade * ± DP	Parasitemia* (%)
100 μg.mL ⁻¹	45±0,7	55
50 μg.mL ⁻¹	43±1,4	57
25 μg.mL ⁻¹	40±0,7	60
12,5 μg.mL ⁻¹	36±1,4	64
6,25 μg.mL ⁻¹	27±1,4	73

Apêndice 4 Resultado dos ensaios *in vitro* da fração CHCL3 da casca da *B. excelsa* frente à cepa 3D7 – *Plasmodium falciparum*. A tabela mostra a viabilidade dos compostos em diferentes concentrações. Os valores apresentam média e ± desvio padrão do percentual de inibição de crescimento do parasito. Diferenças estatisticamente significativas (p< 0,05) em relação ao controle são indicados pelo símbolo (*).

Concentração	Bioatividade * ± DP	Parasitemia (%)
100 μg.mL ⁻¹	24±1,4	76
$50 \mu g.mL^{-1}$	31±1,4	69
25 μg.mL ⁻¹	28±1,7	72
12,5 μg.mL ⁻¹	29±2,1	71
$6,25~\mu g.mL^{-1}$	30±2,1	70

Apêndice 5 Resultado dos ensaios *in vitro* da fração EtOAc da casca da *B. excelsa* frente à cepa 3D7 – *Plasmodium falciparum*. A tabela mostra a viabilidade dos compostos em diferentes concentrações. Os valores apresentam média e ± desvio padrão do percentual de inibição de crescimento do parasito. Diferenças estatisticamente significativas (p< 0,05) em relação ao controle são indicados pelo símbolo (*).

Concentração	Bioatividade * ± DP	Parasitemia (%)
100 μg.mL ⁻¹	76±2,1	24**
50 μg.mL ⁻¹	81±1,4	19
25 μg.mL ⁻¹	72±1,4	28
12,5 μg.mL ⁻¹	71±1,4	29
6,25 μg.mL ⁻¹	70±0,7	30

Apêndice 6 - Resultado dos ensaios *in vitro* da fração Acetona da casca da *B. excelsa* frente à cepa 3D7 - *Plasmodium falciparum*. A tabela mostra a viabilidade dos compostos em diferentes concentrações. Os valores apresentam média e ± desvio padrão do percentual de inibição de crescimento do parasito. Diferenças estatisticamente significativas (p< 0,05) em relação ao controle são indicados pelo símbolo (*).

50 μg.mL ⁻¹ 77	9±0,7 21** 7±3,5 33	
	7+3.5	
25 μg.mL ⁻¹ 77	35	
	7±1,4 33	
12,5 μg.mL ⁻¹	9±1,4 51	
6,25 μg.mL -1	3±0,7 87	

Apêndice 7 Resultado dos ensaios *in vitro* do Extrato etanólico do ouriço da *B. excelsa* frente à cepa 3D7 – *Plasmodium falciparum*. A tabela mostra a viabilidade dos compostos em diferentes concentrações. Os valores apresentam média e ± desvio padrão do percentual de inibição de crescimento do parasito. Diferenças estatisticamente significativas (p< 0,05) em relação ao controle são indicados pelo símbolo (*).

Concentração	Bioatividade * ± DP	Parasitemia (%)
100 μg.mL ⁻¹	65±1,4	35
50 μg.mL ⁻¹	29±1,6	71
25 μg.mL ⁻¹	15±1,6	85
12,5 μg.mL ⁻¹	11±1,2	81
6,25 μg.mL ⁻¹	6±2,8	94

Apêndice 8 Resultado dos ensaios *in vitro* da fração CHCL₃ do ouriço da *B. excelsa* frente à cepa 3D7 – *Plasmodium falciparum*. A tabela mostra a viabilidade dos compostos em diferentes concentrações. Os valores apresentam média e ± desvio padrão do percentual de inibição de crescimento do parasito. Diferenças estatisticamente significativas (p< 0,05) em relação ao controle são indicados pelo símbolo (*).

Concentração	Bioatividade * ± DP	Parasitemia (%)
100 μg.mL ⁻¹	33±1,4	67
$50 \mu g.mL^{-1}$	19±1,4	81
$25~\mu g.mL^{-1}$	19±0,7	33
12,5 μ g.mL ⁻¹	9.5±0,7	51
6,25 μg.mL ⁻¹	15±1,4	87

Apêndice 9 Resultado dos ensaios *in vitro* da fração EtOAc do ouriço da *B. excelsa* frente à cepa 3D7 – *Plasmodium falciparum*. A tabela mostra a viabilidade dos compostos em diferentes concentrações. Os valores apresentam média e ± desvio padrão do percentual de inibição de crescimento do parasito. Diferenças estatisticamente significativas (p< 0,05) em relação ao controle são indicados pelo símbolo (*).

Concentração	Bioatividade * ± DP	Parasitemia (%)
100 μg.mL ⁻¹	53±0,7	47**
$50 \mu g.mL^{-1}$	51±2,4	49
$25 \ \mu g.mL^{-1}$	39±1,4	61
12,5 μ g.mL ⁻¹	18±2,1	82
6,25 μg.mL ⁻¹	15±1,4	85

Apêndice 10 Resultado dos ensaios *in vitro* da fração Acetona do ouriço da *B. excelsa* frente à cepa 3D7 – *Plasmodium falciparum*. A tabela mostra a viabilidade dos compostos em diferentes concentrações. Os valores apresentam média e ± desvio padrão do percentual de inibição de crescimento do parasito. Diferenças estatisticamente significativas (p< 0,05) em relação ao controle são indicados pelo símbolo (*).

Concentração	Bioatividade * ± DP	Parasitemia (%)
100 μg.mL ⁻¹	83±1,4	17
$50 \mu g.mL^{-1}$	78±2,1	22
$25~\mu g.mL^{-1}$	70±1,6	30
12,5 μ g.mL ⁻¹	36±	64
6,25 μg.mL ⁻¹	48±2,4	52

Apêndice 11 Taxa de morte celular (macrófagos) após incubação em diferentes concentrações do Extrato etanólico da casca. Diferenças estatisticamente significativas (p< 0,05) em relação ao controle são indicados pelo símbolo (*).

Concentração	Nº de Células x 10 ⁵ ± D.P	Morte Celular (%)
Controle	100±0	0
D1 100 μg.mL ⁻¹	77 ±4,0	23*
D2 50 $\mu g.mL^{-1}$	89±1,1	11*
D3 25 $\mu g.mL^{-1}$	93±0	7*
D4 12,5 μg.mL ⁻¹	94±0,5	6*
D5 6,2 μg.mL ⁻¹	93±0,5	7*
D6 3,1 μg.mL ⁻¹	92±1,1	8*
D7 1,5 μg.mL ⁻¹	91±1,5	9*

Apêndice 12 Taxa de morte celular (macrófagos) após incubação em diferentes concentrações da Fração EtOAc da casca. Diferenças estatisticamente significativas (p< 0,05) em relação ao controle são indicados pelo símbolo (*).

Concentração	N^o de Células $x 10^5 \pm D.P$	Morte Celular (%)
Controle	100±0	0
D1 100 μg.mL ⁻¹	97±1,2	3
D2 50 μg.mL ⁻¹	97±1,7	3
D3 25 μg.mL ⁻¹	98±0,2	2
D4 12,5 μg.mL ⁻¹	97±2,2	3
D5 6,2 μg.mL ⁻¹	97±2,1	3
D6 3,1 μg.mL ⁻¹	97±1,2	3
D7 1,5 μg.mL ⁻¹	100±0	0

Apêndice 13 - Taxa de morte celular (macrófagos) após incubação em diferentes concentrações da Fração Acetona da casca. Diferenças estatisticamente significativas (p< 0,05) em relação ao controle são indicados pelo símbolo (*).

Concentração	Nº de Células x 10 ⁵ ± D.P	Morte Celular (%)
Controle	100±0	0
D1 100 μg.mL ⁻¹	73±4,6	27*
D2 50 μg.mL ⁻¹	86±2,	14*
D3 25 $\mu g.mL^{-1}$	88±3,7	12*
D4 12,5 μg.mL ⁻¹	89±4,5	11*
D5 6,2 μg.mL ⁻¹	93±1,4	7*
D6 3,1 μg.mL ⁻¹	95±3,6	5
D7 1,5 μg.mL ⁻¹	98±3,2	2

Apêndice 14 Taxa de morte celular (macrófagos) após incubação em diferentes concentrações do Extrato etanólico do ouriço. Diferenças estatisticamente significativas (p< 0,05) em relação ao controle são indicados pelo símbolo (*).

Concentração	N°de Celulas x 10 ⁵ ± SD	Morte Celular (%)
Controle	100±0	0
D1 100 μg.mL ⁻¹	$10 \pm 1,5$	90*
D2 50 μg.mL ⁻¹	87±2	13*
D3 25 $\mu g.mL^{-1}$	88±2,6	12*
D4 12,5 μg.mL ⁻¹	88±2,6	6*
D5 6,2 μg.mL ⁻¹	87±7,8	13*
D6 3,1 μg.mL ⁻¹	85±4,9	15*
D7 1,5 μg.mL ⁻¹	91±2	9*

Apêndice 15 Taxa de morte celular (macrófagos) após incubação em diferentes concentrações da Fração EtOAc do ouriço. Diferenças estatisticamente significativas (p< 0,05) em relação ao controle são indicados pelo símbolo (*).

Concentração	Nºde Células x 10⁵ ± SD	Morte Celular (%)
Controle	100±0	0
D1 100 μ g.mL ⁻¹	57±4,8	43*
D2 50 μg.mL ⁻¹	63±6,2	37*
D3 25 $\mu g.mL^{-1}$	63±6,2	37*
D4 12,5 μ g.mL ⁻¹	90±2,9	10
D5 6,2 μg.mL ⁻¹	91±3,80	9
D6 3,1 μg.mL ⁻¹	92±12	8
D7 1,5 μg.mL ⁻¹	89±9,5	11

Apêndice 16 Taxa de morte celular (macrófagos) após incubação em diferentes concentrações da Fração Acetona do ouriço. Diferenças extremamente significativas (p< 0,05) em relação ao controle são indicados pelo símbolo (***).

Concentração	N°de Celulas x 10 ⁵ ± SD	Morte Celular (%)
Controle	100±0	0
D1 100 μg.mL ⁻¹	35±2,5	65***
D2 50 μg.mL ⁻¹	48±3,5	52***
D3 25 μg.mL ⁻¹	45±2,5	55***
D4 12,5 μg.mL ⁻¹	85±2	15***
D5 6,2 μg.mL ⁻¹	89±1	11***
D6 3,1 μg.mL ⁻¹	88±2	12***
D7 1,5 μg.mL ⁻¹	84±1,5	16***