



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Antônio Vinícius Doriguetto Ferreira

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E POTENCIAL ANTIMALÁRICO DE *Andira nitida*  
Mart. ex Benth**

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Fabíola Dutra Rocha

Juiz de Fora  
2013

**Antônio Vinícius Doriguetto Ferreira**

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E POTENCIAL ANTIMALÁRICO DE *Andira nitida*  
Mart. ex Benth**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Juiz de Fora como parte integrante dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Produtos Naturais Bioativos.

**ORIENTADORA:** Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Fabíola Dutra Rocha

**Juiz de Fora, 2013**

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Ferreira, Antônio Vinícius Doriguetto.  
Caracterização química e potencial antimalárico de Andira nitida Mart. ex Benth / Antônio Vinícius Doriguetto Ferreira. -- 2013.  
148 f. : il.

Orientadora: Fabíola Dutra Rocha  
Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2013.

1. Andira nitida. 2. Fitoquímica. 3. Potencial antioxidante. 4. Atividade antimalárica. 5. Isoflavonas. I. Rocha, Fabíola Dutra, orient. II. Título.

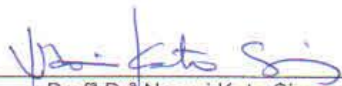
**Caracterização química e potencial antimalárico de *Andira nitida* Mart.  
ex Benth**

**Antônio Vinícius Doriguetto Ferreira**

**ORIENTADOR (A): Profª Drª Fabíola Dutra Rocha**

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 30 / 07 / 2013



Profª Drª Naomi Kato Simas - UFRJ



Profª Drª Clarice Abramo - UFJF



Profª Drª Fabíola Dutra Rocha - UFJF

**O sonho é como o horizonte, a cada passo que damos em sua direção, ele se afasta um passo.**

**- Então para que serve o sonho?**

**- Serve para nos fazer caminhar.**

**(E. Galeano)**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me carregado em seus braços quando as forças me faltaram e o objetivo parecia longínquo e inalcançável. Sem o Seu amparo nada poderia ter feito.

Aos meus pais e a minha irmã, fontes de toda esta luta. Eu sei que meus sonhos são os seus também e se mais um foi concluído é porque me deram uma base firme onde pude edificar cada um deles...

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Fabíola, pela paciência, dedicação e auxílio no desenvolvimento deste trabalho. Levarei seu exemplo para toda a vida. Palavras nunca serão capazes de expressar o quão agradecido sou por tudo que aprendi contigo.

A Prof<sup>a</sup> Magda Narciso Leite por acreditar em mim desde a graduação, pelas palavras carinhosas quando o desânimo aparecia. Se estou aqui é porque me inspirei em seu modelo.

Ao Prof. Dr. Orlando Vieira de Sousa que contribui imensamente para que este projeto se realizasse. Nunca esquecerei o apoio e a atenção.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Silvana Alves que além de amiga e conselheira, tornou a caminhada mais leve com suas palavras, conselhos e incentivo.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Tatiana Konno pela identificação do material botânico.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Clarice Abramo pela colaboração no ensaio antimalárico *in vivo*, além da disponibilidade e da gentileza.

Aos alunos e professores da UFRJ-Macaé, Graziella Moreira, Marcelo Santana, Anna Machado, Ana Elisa Silva, Naomi Simas, Gilberto Zanetti e Tatiana Konno pela coleta do material botânico. Sem a ajuda de vocês nada poderia ter feito!

Aos amigos e alunos de iniciação científica, Daniela Kafuri e Francisco da Guia, que fizeram dos meus dias no laboratório de farmacognosia mais felizes.

À Luana Justus que contribuiu muito com suas habilidades científicas, sua dedicação exemplar, além dos dotes culinários. A melhor aluna de iniciação científica que eu poderia ter!

À Célia Chagas, meu anjo da guarda, por estar sempre disposta a ajudar. Seu auxílio foi indispensável no desenvolvimento deste trabalho. Os dias foram mais tranquilos com sua presença tão amorosa.

Aos meus amigos de ontem, hoje e sempre pelo incentivo, carinho e por estarem presentes em cada sucesso, fracasso, recomeço.

Às amigas da Pós-Graduação: Érika Suzuki, Mirna Meana, Clarissa Campos, Isabela Moreira, Kamilla Coelho, Lívia Fontes e Michele Campos por serem tão queridas e

compartilharem comigo tantos momentos de alegria e de angústia. Vocês foram essenciais nesta caminhada e nada irá nos afastar.

À amiga Carolina Gasparetto pelas aulas de música e apoio técnico na parte biológica.

Ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora pela oportunidade da realização do Mestrado.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

Às agências financiadoras dos projetos CNPq Universal 2010, Rede Malária 2010, PENSA RIO - FAPERJ 2010, BIOTA - FAPERJ 2010 dos quais minha dissertação faz parte, pelo aporte financeiro para a realização dessa proposta.

Aos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho o meu eterno  
**MUITO OBRIGADO!**

FERREIRA, A.V. D. Caracterização química e potencial antimalárico de *Andira nitida* Mart. ex Benth. 2013. 148p. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais.

## RESUMO

As espécies do gênero *Andira* (Fabaceae), popularmente conhecidas como “angelins”, destacam-se pelo uso popular como febrífugas, vermífugas e antimaláricas. Apesar das evidências da atividade antimalárica das espécies do gênero, existe uma carência de estudos químicos e biológicos em torno da espécie *Andira nitida*. Desta forma, este trabalho objetivou estabelecer o perfil químico e avaliar o potencial biológico de *A. nitida*, a fim de encontrar uma possível opção de novos alvos terapêuticos para o tratamento da malária. O perfil químico foi estabelecido por cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia em fase líquida de alta eficiência (CLAE), após a análise dos cromatogramas constatou-se a presença de derivados fenólicos, especialmente, flavonoides como as isoflavonas e de derivados de catequina. O conteúdo de derivados fenólicos totais variou de 100-320 mg de equivalente em catequina/g amostra e de 90-280 mg de equivalente em ácido gálico/ g amostra, já o de isoflavonoides de 6,24-11,15 mg de equivalente em biochanina A/g amostra e o de flavonoides totais de 1,20-4,55 mg de equivalente em quercetina/g amostra. As  $CE_{50}$  para o método DPPH variaram de 5,99-31,90  $\mu\text{g/mL}$ . Os valores da atividade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC) para as amostras foram de 0,161-0,693. Foi encontrada forte correlação entre atividade antioxidante por DPPH e o conteúdo de derivados fenólicos (Pearson > 0,9) e entre TEAC e o teor de flavonoides expressos em quercetina (Pearson > 0,83). A fração em hexano e em clorofórmio apresentaram  $CE_{50}$  de 40,5  $\mu\text{g/mL}$  e 136,2  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente, no ensaio de quantificação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (SRAT). As amostras mais ativas no ensaio antiplasmodial (Teste LDH) foram as frações em hexano e em clorofórmio com 31% de inibição do crescimento de *P. falciparum*. Já no ensaio de inibição da polimerização da ferritoporfirina (FBIT) as  $CE_{50}$  variaram de 0,41-1,12 mg/mL sendo as frações em hexano, clorofórmio e em acetato de etila ativas, juntamente com o extrato lipofílico. *In vivo*, estas amostras a 200 mg/kg/dia foram ativas no teste de Peters com inibições da parasitemia de 39-75% no sétimo dia após a infecção. Os resultados indicaram que *A. nitida* apresenta perfil químico predominante em isoflavonas, corroborado pela quantificação de isoflavonoides, dessa forma ratifica-se o papel das isoflavonas como possíveis marcadores quimiossistemáticos do gênero *Andira*, além de responsáveis, em parte, pela atividade antimalárica das espécies estudadas até o presente momento. Além disso, as amostras provenientes dos galhos de *A. nitida* podem ser fontes de substâncias bioativas com pronunciada atividade antioxidante, além de interessante atividade antimalárica.

Palavras-chaves: *Andira nitida*. Fitoquímica. Potencial Antioxidante. Atividade Antimalárica. Isoflavonas.



FERREIRA, A. V. D. Chemical characterization and antimalarial potential of *Andira nitida* Mart. ex Benth. 2013. 148p. Dissertation (Master of Pharmaceutical Sciences). Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais.

### ABSTRACT

The *Andira* species (Fabaceae), popularly known as "Angelins" stand out for popular use as febrifuge, vermifuge and antimalarial. Chemically they are characterized by the presence of phenolic derivatives such as isoflavones. However, despite evidence of antimalarial activity of the genus, there is a lack about chemical and biological studies of *Andira nitida*. So the present study aimed to establish the chemical profile and assess the biological potential of *A. nitida*, to find a possible option for new therapeutic targets for the malaria treatment. The chemical profile was established by thin layer chromatography (TLC) and high performance liquid chromatography (HPLC), after analysis of the chromatograms; they showed the predominant presence of phenolic derivatives, especially flavonoids such as isoflavones and catechin derivatives. The contents of phenolic derivatives ranged from 100 to 320 mg catechin equivalent/g sample and from 90 to 280 mg gallic acid equivalent/g sample. The isoflavonoids content ranged from 6.24 to 11.15 mg equivalent biochanin A/g sample and flavonoids content ranged from 1.20 to 4.55 mg quercetin equivalent/g sample. The EC<sub>50</sub> for DPPH ranged from 5.99-31.90 µg/mL. Trolox equivalent antioxidant activity (TEAC) values for the samples were 0.161 to 0.693. Strong correlation was found between oxidant activity by DPPH and content of phenolic derivatives (Pearson > 0.9) and between TEAC and the flavonoids content expressed in quercetin (Pearson > 0.83). The fraction in hexane and in chloroform showed EC<sub>50</sub> of 40.5 µg/mL and 136.2 µg/mL, respectively; in the quantification of thiobarbituric acid reactive substances assay (TBARS). The more active samples in antiplasmodial assay (LDH testing) were the fractions in hexane and in chloroform with 31% inhibition of *P. falciparum* growth. In the ferriprotoporphyrin polymerization inhibition assay (FBIT) the EC<sub>50</sub> ranging from 0.41 to 1.12 mg/ml and the fractions in hexane, in chloroform and in ethyl acetate were actives along with the lipophilic extract. *In vivo*, these samples at 200 mg/kg/day (Peters testing) showed parasitaemia inhibitions of 39-75 % in day 7 after infection. The results indicated that *A. nitida* presents chemical profile composed of isoflavones, corroborated by quantification of isoflavones, and thus confirms the role of isoflavones as potential chemosystematic markers of *Andira* genus. Furthermore, the samples from *A. nitida* can be a source of bioactive substances with pronounced antioxidant activity, as well as interesting antimalarial activity thus can be an alternative for future therapeutic applications.

Keywords: *Andira nitida*. Phytochemistry. Antioxidant Potencial. Antimalarial Activity. Isoflavones.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ABTS – Ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico
- ACN – Acetonitrila
- BHT – Butil-hidroxitolueno
- DPPH – 2,2-difenil-1-picrilhidrazila
- EA – Atividade antirradical
- CE<sub>50</sub> – Concentração mínima da substância antioxidante necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do DPPH.
- CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- DMSO – Dimetilsulfóxido
- DP – Desvio Padrão
- EAG – Equivalente em Ácido Gálico
- EB – Equivalente em Biochanina A
- EC – Equivalente em Catequina
- EQ – Equivalente em Quercetina
- EEAA – Extrato Hidroalcoólico dos Galhos de *Andira nitida*
- EHDA – Extrato Lipofílico dos Galhos de *A. nitida*
- EROs – Espécies Reativas de Oxigênio
- ERNs – Espécies Reativas de Nitrogênio
- FCA – Fração em Clorofórmio
- FAEA – Fração em Acetato de Etila
- FBA – Fração em Butanol
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Peróxido de Hidrogênio
- HO<sub>2</sub><sup>•</sup> – Radical Hidroperoxila
- O<sub>2</sub><sup>•-</sup> – Radical superóxido
- OH<sup>•</sup> – Radical Hidroxil
- PG – Propilgalato
- TEAC – Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox
- TROLOX – 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico
- UV – Ultravioleta
- WHO – World Health Organization

## SUMÁRIO

	Pag.
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. Gênero <i>Andira</i> .....	4
2.2. <i>Andira nitida</i> Mart. Ex Benth.....	8
2.3. Malária.....	10
2.4. Ocorrência da malária.....	11
2.5. Agentes etiológicos e ciclo biológico.....	15
2.6. Terapia da malária.....	18
2.7. Estresse oxidativo: relação com a malária.....	27
2.8. Malária e produtos naturais.....	32
2.9. Métodos de avaliação da atividade antimalárica.....	35
2.9.1. Métodos <i>in vitro</i> .....	35
2.9.2. Método <i>in vivo</i> .....	37
3. OBJETIVOS.....	39
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	41
4.1. Caracterização Química da espécie vegetal <i>Andira nitida</i> .....	41
4.1.1. Material vegetal.....	41
4.1.2. Equipamentos e reagentes.....	41
4.1.3. Obtenção dos extratos e frações semi-purificadas.....	44
4.1.4. Obtenção do perfil cromatográfico por Cromatografia em Camada Delgada dos extratos e frações semi-purificadas.....	46
4.1.5. Verificação do perfil cromatográfico das amostras por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	47
4.1.6. Doseamento do conteúdo de derivados fenólicos.....	49
4.1.7. Quantificação de derivados flavonoídicos.....	50
4.1.8. Correlação entre os teores de metabólitos secundários e atividades biológicas.....	53
4.2. Atividades Biológicas da espécie vegetal <i>Andira nitida</i> .....	53
4.2.1. Verificação do potencial antioxidante dos extratos e frações.....	53

4.2.1.1.	Bioautografia em placa de sílica gel revelada com solução de 1,1-difenil-2-picrilidrazila (DPPH).....	53
4.2.1.2.	Ensaio espectrofotométrico de redução do radical 1,1-difenil-2-picrilidrazila (DPPH).....	54
4.2.1.3.	Método colorimétrico de redução do ABTS <sup>•+</sup> (determinação da capacidade antioxidante equivalente ao trolox - TEAC).....	55
4.2.1.4.	Dosagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico formadas na peroxidação de lipossomos.....	57
4.2.2.	Verificação do potencial antimalárico dos extratos e frações.....	58
4.2.2.1	Teste de inibição do crescimento do <i>P. falciparum</i> em culturas <i>in vitro</i> (Teste LDH).....	58
4.2.2.2.	Teste espectrofotométrico de inibição da polimerização da ferriprotoporfirina (FBIT) ou inibição da polimerização do heme.....	59
4.2.2.3.	Teste da Supressão da Parasitemia “ <i>in vivo</i> ” (Teste de Peters).....	60
4.2.2.4.	Correlação da atividade antioxidante obtida pela quantificação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (SRAT) e a atividade antimalárica pelo ensaio de inibição da polimerização da ferriprotoporfirina (FBIT), das frações em hexano (FHA) e em clorofórmio (FCA).....	61
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	62
5.1.	Caracterização Química de <i>A. nítida</i> .....	62
5.2.	Atividades Biológicas da espécie vegetal <i>Andira nítida</i> .....	96
5.2.1.	Potencial antioxidante.....	96
5.2.2.	Potencial antimalárico dos extratos e frações.....	110
6.	CONCLUSÃO.....	123
	REFERÊNCIAS.....	124

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1: Isoflavonas isoladas de <i>Andira parviflora</i> .....	4
Figura 2: Isoflavonas isoladas de <i>Andira inermis</i> .....	5
Figura 3: Estruturas químicas de Andinermal A, Andinermal C, Andiol A, Andiol B e Andinermol.....	6
Figura 4: Componentes químicos isolados das raízes de <i>Andira fraxinifolia</i> .....	6
Figura 5: Substâncias com atividade anti-helmíntica isoladas de <i>A. anthelmia</i> .....	7
Figura 6: Estruturas químicas dos flavonoides e isoflavonoides isolados das raízes de <i>A. humilis</i> .....	8
Figura 7: Coleção botânica de <i>A. nitida</i> .....	9
Figura 8: Classificação dos países pelo estágio de eliminação da malária, dezembro de 2012.....	10
Figura 9: Mapa do Risco de Transmissão pela Incidência Parasitária Anual (IPA) da Malária no Brasil.....	12
Figura 10: Registro mensal de casos de malária. Amazônia Legal 2004 a 2011.....	14
Figura 11: Ciclo biológico do <i>Plasmodium</i> sp.....	17
Figura 12: Sítios de ação dos fármacos antimaláricos e novos alvos.....	19
Figura 13: Via catabólica de degradação da hemoglobina dentro do vacúolo digestivo de <i>P. falciparum</i> .....	20
Figura 14: Estrutura química de (a) grupo heme, (b) hematina e (c) $\beta$ -hematina.....	21
Figura 15: Proposta de formação do cristal de hemozoína, feita por Egan 2008. a) <i>Pf: Plasmodium falciparum</i> , VT: vesícula transportadora, Hb: hemoglobina. b) hemoglobina é transportada para dentro do vacúolo digestivo (VD), sendo (c) metabolizada a peptídeos que serão exportados (d) do VD, metabolizados a aminoácidos que serão utilizados pelo parasito. O heme (Fe(II)PPIX) liberado pela Hb (e) é oxidado (f) a Fe(III)PPIX e ânion superóxido ( $O_2^-$ ). O (Fe(III)PPIX) forma um dímero (g) que é ‘incorporado’ (h) em um ‘corpo’ lipídico, onde finalmente forma-se (I) o cristal de hemozoína.....	22
Figura 16: Estruturas dos álcoois quinolínicos: Quinina (A) e Mefloquina (C), e das 4-aminoquinolinas: Cloroquina (B), Amodiaquina (D), Hidroxi-cloroquina (E).....	24

Figura 17:	Estrutura química da Primaquina.....	25
Figura 18:	Estruturas químicas da Sulfadoxina (1) e Pirimetamina (2).....	25
Figura 19:	Estruturas químicas da Atovaquona (1) e Proguanil (2).....	26
Figura 20:	Estruturas químicas da artemisinina e seus derivados.....	27
Figura 21:	Estrutura química da licochalcona A.....	34
Figura 22:	Obtenção das frações a partir dos galhos de <i>Andira nitida</i> .....	45
Figura 23:	Varredura 500-200 nm da solução de biochanina 30 µg/mL (linha preta) e solução complexada com AlCl <sub>3</sub> (linha azul), demonstrando a absorção a 365 nm (UV <sub>Max</sub> ).....	51
Figura 24:	Cromatoplasmas do extrato bruto hidroalcoólico e suas respectivas frações. Sistema eluente: CHCl <sub>3</sub> :MeOH 9:1. Reveladores utilizados (A): sulfato cérico, (B): FeCl <sub>3</sub> , (C): NP/PEG e d): vanilina sulfúrica.....	64
Figura 25:	Cromatograma dos padrões. Sistema eluente: CHCl <sub>3</sub> :MeOH 9:1. Revelador vanilina sulfúrica.....	64
Figura 26:	<b>a)</b> Tempo de retenção e espectro de UV dos padrões – CLAE.....	67
	<b>b)</b> Tempo de retenção e espectro de UV dos padrões – CLAE.....	68
	<b>c)</b> Tempo de retenção e espectro de UV dos padrões – CLAE.....	69
Figura 27:	Cromatograma do extrato bruto hidroalcoólico de <i>A. nitida</i> (EEAA).....	71
Figura 28:	<b>a)</b> Espectros de UV e tempos de retenção das substâncias do extrato hidroalcoólico de <i>A. nitida</i> (EEAA).....	72
	<b>b)</b> Espectros de UV e tempos de retenção das substâncias do extrato hidroalcoólico de <i>A. nitida</i> (EEAA).....	73
Figura 29:	Cromatograma da fração em acetato de etila (FAEA).....	74
Figura 30:	<b>a)</b> Espectros de UV e tempos de retenção das substâncias da fração em acetato de etila (FAEA).....	75
	<b>b)</b> Espectros de UV e tempos de retenção das substâncias da fração em acetato de etila (FAEA).....	76
Figura 31:	Cromatograma da fração em butanol (FBA).....	77
Figura 32:	<b>a)</b> Espectros de UV e tempos de retenção das substâncias da fração em butanol (FBA).....	78
	<b>b)</b> Espectros de UV e tempos de retenção das substâncias da fração em butanol (FBA).....	79

	c) Espectros de UV e tempos de retenção das substâncias da fração em butanol (FBA).....	80
Figura 33:	Cromatograma do resíduo do liofilizado após as partições (REEAA).....	81
Figura 34:	a) Espectros de UV e tempos de retenção das substâncias do resíduo do liofilizado após as partições (REEAA).....	82
	b) Espectros de UV e tempos de retenção das substâncias do resíduo do liofilizado após as partições (REEAA).....	83
	c) Espectros de UV das substâncias do resíduo do liofilizado após as partições (REEAA).....	84
Figura 35:	Cromatograma da fração em clorofórmio (FCA).....	85
Figura 36:	a) Espectros UV e tempos de retenção das substâncias da fração em clorofórmio (FCA).....	86
	b) Espectros UV e tempos de retenção das substâncias da fração em clorofórmio (FCA).....	87
Figura 37:	Cromatograma revelado com solução a 0,2% de DPPH em metanol, indicando a presença de substâncias com potencial antioxidante.....	97
Figura 38:	Curvas cinéticas do controle positivo (Trolox) e as amostras provenientes de <i>A. nitida</i> .....	104

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Dados epidemiológicos de malária, por estado. Amazônia Legal, janeiro a dezembro de 2010 e 2011.....	15
Tabela 2:	Prospecção fitoquímica dos extratos e frações semipurificadas de <i>Andira nitida</i> .....	63
Tabela 3:	Comparação dos tempos de retenção (TR) das substâncias presentes nos cromatogramas da Fração Butanólica (FBA), Fração Acetato de Etila (FAEA) e Extato bruto hidroalcoólico de <i>A. nitida</i> (EEAA).....	70
Tabela 4:	Doseamento de derivados fenólicos expressos em equivalente em ácido gálico e em catequina.....	91
Tabela 5:	Quantificação de derivados flavonoídicos expressos como média mais desvio padrão obtida pelas três determinações.....	95
Tabela 6:	CE <sub>50</sub> das amostras e padrões frente ao radical DPPH.....	98
Tabela 7:	Análise estatística pela Correlação de Pearson entre o teor de derivados fenólicos total e a atividade antioxidante obtida pelo método DPPH.....	109
Tabela 8:	Correlação entre o teor de isoflavonoides e flavonoides com a atividade antioxidante determinada pelo TEAC.....	110
Tabela 9:	Percentual de redução do crescimento de <i>P. falciparum</i> cloroquina-resistente (W2) na presença amostras obtidas de <i>A. nitida</i> .....	111
Tabela 10:	CE <sub>50</sub> médias obtidas pela avaliação da atividade sobre a polimerização da hemina medida por três ensaios independentes com desvio padrão dos extratos e frações de <i>A. nitida</i> .....	114
Tabela 11:	Inibição da multiplicação parasitária quantificada no 5°, 7°, 9° e 12° dia após a infecção.....	117
Tabela 12:	Sobrevida dos camundongos por dias pós-infecção com <i>P. berghei</i> .....	119
Tabela 13:	Resultados da atividade das amostras obtidas a partir dos galhos de <i>Andira nitida</i> nos três modelos farmacológicos empregados para verificação do potencial antimalárico.....	120



## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1:	Curvas analíticas sobrepostas de ácido gálico, obtidas para a quantificação de derivados fenólicos totais por espectrofotometria no ultravioleta-visível em $\lambda$ 760 nm.....	89
Gráfico 2:	Curva analítica de ácido gálico equivalente aos três dias de ensaio. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão. A equação da reta e o $R^2$ se referem a média das três curvas.....	89
Gráfico 3:	Curvas de analítica sobrepostas de catequina, obtidas para a quantificação de derivados fenólicos totais por espectrofotometria no ultravioleta-visível em $\lambda$ 760 nm.....	90
Gráfico 4:	Curva analítica de catequina equivalente aos três dias de ensaio. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão. A equação da reta e o $R^2$ se referem à média das três curvas.....	90
Gráfico 5:	Curva analítica de biochanina A equivalente aos três dias de ensaio. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão. A equação da reta e o $R^2$ se referem à média das três curvas.....	93
Gráfico 6:	Curva analítica de quercetina equivalente aos três dias de ensaio. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão. A equação da reta e o $R^2$ se referem à média das três curvas.....	94
Gráfico 7:	Concentrações efetivas 50% (média de 3 determinações) com desvio padrão para o extrato hidroalcoólico dos galhos de <i>A. nitida</i> e suas frações e dos controles positivos (extrato padronizado de <i>Ginkgo biloba</i> e quercetina).....	98
Gráfico 8:	Valores de TEAC obtidos das três determinações mais o desvio padrão das amostras obtidos no ensaio de redução do radical ABTS <sup>+</sup> .....	103
Gráfico 9:	CE <sub>50</sub> mais desvio padrão obtidas no ensaio de peroxidação lipídica da fração em hexano (FHA), fração em clorofórmio (FCA) e controles positivos extrato seco padronizado de <i>Ginkgo biloba</i> (GB) e Propilgalato (PG).....	108
Gráfico10:	Supressão da parasitemia de camundongos infectados por <i>P. berghei</i> , tratados com amostras de <i>A. nitida</i> e CQ, nos dias pós infecção.....	117

## 1. INTRODUÇÃO

As plantas têm sido usadas como fonte de medicamentos ao longo da história e continuarão a servir como a base para a descoberta de muitos fármacos. Neste contexto, a medicina tradicional não só fornece pistas valiosas para encontrar novos medicamentos, mas também pode ajudar a mudar o paradigma de "encontrar drogas novas" para "combinação dos agentes existentes", e pode até mesmo direcionar as combinações entre esses agentes (GINSBURG & DEHARO, 2011).

Uma alternativa muito valiosa é o estudo e pesquisa do potencial biológico das plantas como fonte de novas alternativas terapêuticas para o tratamento de doenças tropicais, inclusive a malária. Neste cenário, o Brasil se destaca por sua imensa biodiversidade vegetal. (TIUMAN et al., 2005; ESTEVEZ et al., 2007).

A pesquisa com produtos naturais já contribuiu, por exemplo, para a descoberta de novas drogas antimaláricas. O tratamento da malária consiste basicamente na utilização dos derivados quinolínicos (cloroquina, mefloquina, amodiaquina), os antagonistas do folato (sulfadoxina e pirimetamina) e os derivados da artemisinina, sendo a maioria originada da pesquisa de plantas medicinais (TALISUNA et al., 2004; DONDORP et al., 2010). Assim, pode-se visualizar a contribuição variada de recursos naturais para o desenvolvimento de fármacos antimaláricos eficazes, particularmente valiosas para o tratamento de parasitos resistentes à cloroquina (GINSBURG & DEHARO, 2011). Esta própria é um derivado sintético que teve como modelo estrutural a quinina, um antimalárico de fonte natural usado extensivamente por vários séculos.

O gênero *Andira*, família Fabaceae, é muito promissor em atividades biológicas; tem sido utilizado popularmente como febrífugo, vermífugo, inseticida e antimalárico (ALMEIDA et al., 2008). Na Europa, profissionais de saúde indicavam o consumo do pó das cascas para uso medicinal (SILVA et al., 2008). Quimicamente, o gênero é rico em derivados fenólicos, especialmente flavonoides como as isoflavonas, sendo estas ativas contra *P. falciparum in vitro* (KRAFT et al., 2000, 2001; GARCEZ et al., 2010; SILVA et al., 2006, 2008). Encontram-se registros na literatura de estudos que demonstram a atividade antimalárica *in vitro* de espécies deste gênero (KRAFT et al., 2000; 2001).

A malária humana é uma patologia que representa um desafio para a saúde pública em muitos países do mundo, caracteriza-se como uma doença causada pela infecção por *Plasmodium*, o qual é transmitido por mosquitos do gênero *Anopheles*. Os sintomas típicos

incluem ataques febris que são induzidos pela lise de hemácias. Portanto, a anemia é pronunciada após a infecção pelo *Plasmodium* (WHITE et al., 2004). A incidência mundial anual, baseada em estimativas de diversos órgãos, é pouco precisa. No ano de 2010, 219 milhões de pessoas foram acometidas de malária e 660 mil morreram. Dentre os países mais afetados, podem-se destacar os africanos, situados ao sul do deserto do Saara, os do Sudeste Asiático e os da América Latina, particularmente os situados na região da Bacia Amazônica (WHO, 2012; OPAS 2001).

As principais causas do agravamento da situação mundial da malária são: instabilidade térmica, os problemas com o tratamento devido aos deslocamentos de grande número de pessoas causados por guerra e conflitos civis, a AIDS, a baixa adesão ao tratamento e o surgimento de resistência aos medicamentos em uso, sendo este o principal fator (TOLER, 2005; HAY, 2004).

A luta contra a malária foi identificada pelo *United Nations in the Millennium Development Goals*, uma organização mundial que trabalha para erradicar a pobreza extrema, como um dos seus objetivos e permanece como uma das prioridades da Organização Mundial de Saúde. Dessa forma, a quimioterapia tem um papel central para a efetiva redução da mortalidade relacionada à malária, até uma vacina ser aprovada (ZOFOU et al., 2011).

Atualmente, já existem cepas resistentes a praticamente todos os antimaláricos, fato este justificado pelo uso indiscriminado destes fármacos (GOLENSER et al., 2006). Um parasito é considerado resistente caso seja capaz de reproduzir assexuadamente na fase sanguínea, apesar da terapêutica empregada (BAIRD, 2009). Até mesmo para a artemisinina já existem cepas de *P. falciparum* resistentes, as quais foram isoladas de pacientes do Camboja (WELLS, 2011; DONDORP et al., 2010). Assim o desenvolvimento de novas drogas constitui o principal desafio dos dias atuais (ZOFOU et al., 2011).

No Brasil, a malária ainda é um grave problema de saúde pública e representa uma das doenças parasitárias mais importantes da região tropical. Na região denominada Amazônia Legal concentram-se 99% dos casos de malária, permanecendo endêmica e com aproximadamente 300.000 casos confirmados anualmente (BRASIL, 2009). Em 2011 foram 267 045 mil casos causados majoritariamente por *P. vivax* (87%), mas existem infecções por *P. falciparum* (13%) (WHO, 2012).

A terapia da malária visa atingir pontos chaves do ciclo evolutivo do parasito e mostra-se complexa devido aos casos de resistência do *P. falciparum*, reações adversas resultantes da toxicidade às células do hospedeiro, além da reinfeção dos pacientes residentes

nas áreas endêmicas, dessa forma novos agentes para o tratamento se fazem necessários (FATTORUSSO, TAGLIALATELA-SCAFATI, 2009).

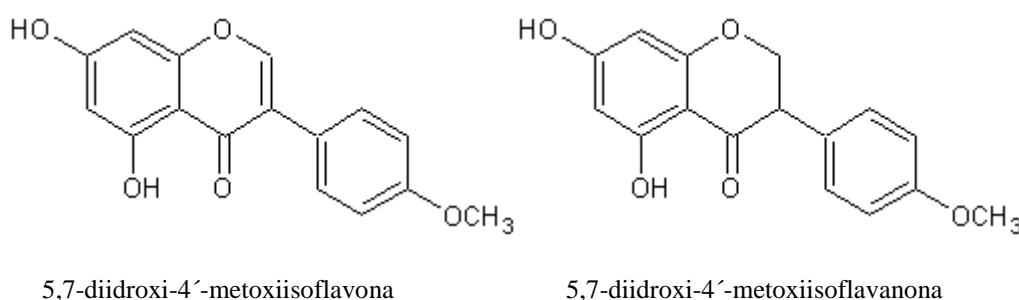
A escolha da espécie *Andira nitida* para o desenvolvimento desta proposta, foi baseada no fato dessa espécie ter uma carência de estudos químico e biológico, bem como por se tratar de uma espécie nativa, de ocorrência e facilidade de coleta na restinga, a qual está sob crescente pressão antrópica. Em virtude disso, surgiu o interesse de estudá-la, no intuito de registrar o perfil químico da espécie, contribuindo para o estabelecimento de marcadores químicos para o gênero *Andira*, o que é fundamental para o desenvolvimento do controle de qualidade químico. Bem como, avaliar o potencial biológico da espécie, em especial seu potencial antimalárico, uma vez que há registro em publicações científicas do uso popular de espécies do gênero *Andira* para o tratamento de febre, como vermífugo e antimalárico. Dessa forma, visa-se encontrar uma possível opção de novos alvos terapêuticos para o tratamento da malária.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Gênero *Andira*

O gênero *Andira* compreende espécies vegetais pertencentes à família Fabaceae, popularmente conhecidos por angelins, totalizando mais de 30 espécies distribuídas na América Tropical, com uma na África (MATOS, 1979; PENNINGTON & LIMA, 1995), sendo a maioria nativa do Brasil que apresenta 27 espécies e 7 variedades. Deste total, o maior número de exemplares é encontrado na Região Amazônica. Devido às propriedades vermífugas, esse gênero é utilizado na Europa desde 1755, por médicos e farmacêuticos de diversos países que preconizavam a industrialização das cascas, transformando-as em pó, com o qual procuravam obter uma droga de aplicação anti-helmíntica (MATOS, 1979). Algumas espécies que pertencem ao gênero *Andira* ainda são utilizadas popularmente como anti-helmínticas, apesar de seus efeitos tóxicos. Silva e colaboradores (2008) demonstraram a toxicidade de *A. anthelmia* no ensaio de atividade anti-hemíntica onde foi verificado um alto número de cobaias mortas pelas altas doses dos extratos e frações testados.

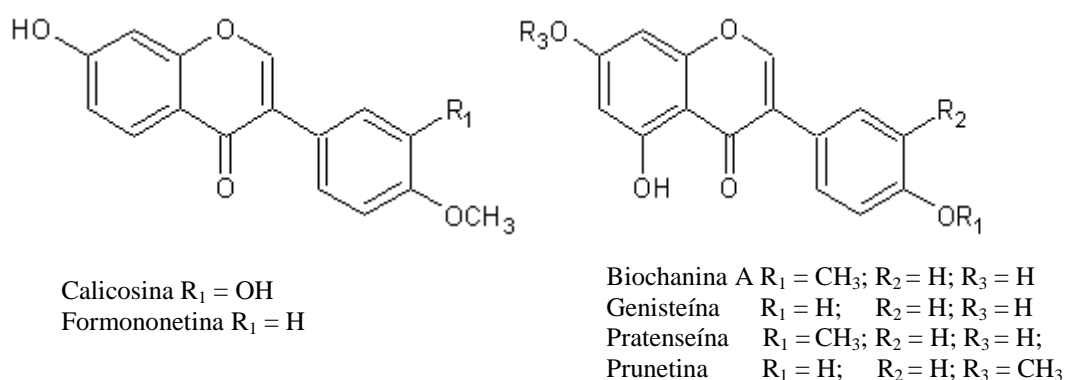
Em 1973, Braz-Filho e colaboradores, em um trabalho de isolamento e determinação estrutural de derivados flavonoídicos de espécies de Fabaceae da Amazônia, isolaram e identificaram, a partir do extrato em hexano da madeira do tronco de *Andira parviflora* Ducke, biochanina A (5,7-diidroxi-4'-metoxiisoflavona) e ( $\pm$ )-5,7-diidroxi-4'-metoxiisoflavanona, esta última descrita pela primeira vez (Figura 1).



**Figura 1:** Isoflavonas isoladas de *Andira parviflora*. Fonte: BRAZ-FILHO et al., 1973

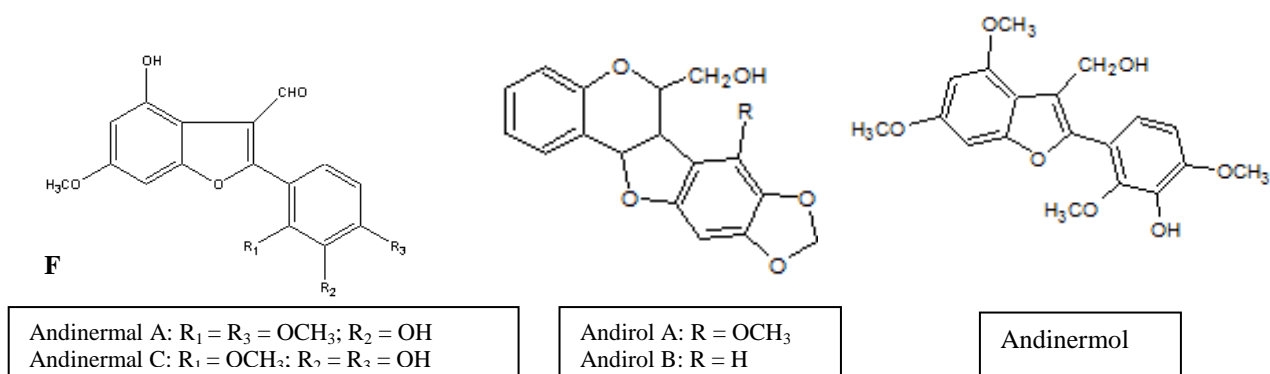
A casca do caule e sementes de *Andira inermis* têm sido reportados na medicina popular como vermífugo, purgativo e febrífugo. Em particular, tem sido atribuída ao pó das cascas a eficácia contra febre intermitente. O fracionamento biomonitorado de extratos lipofílicos dos caules e folhas de *A. inermis* rendeu seis isoflavonas: biochanina A, calicosina, formononetina, genisteína, pratenseína, e prunetina (Figura 2). O extrato lipofílico das folhas

e de galhos de *A. inermis* exibiram atividade *in vitro* contra *P. falciparum* com  $CE_{50}$  de 56  $\mu\text{g/mL}$  e 108,7  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Os extratos hidrofílicos mostraram-se inativos. A atividade antiplasmodial das isoflavonas isoladas do caule foi avaliada para duas cepas de plasmódio, poW (sensível à cloroquina) e Dd2 (resistente à cloroquina). As mais ativas foram a calicosina ( $CE_{50}$  4,2  $\mu\text{g/mL}$  para poW; 9,8  $\mu\text{g/mL}$  para Dd2) e genisteína ( $CE_{50}$  2,0  $\mu\text{g/mL}$  para poW; 4,1  $\mu\text{g/mL}$  para Dd2) (KRAFT et al, 2000).



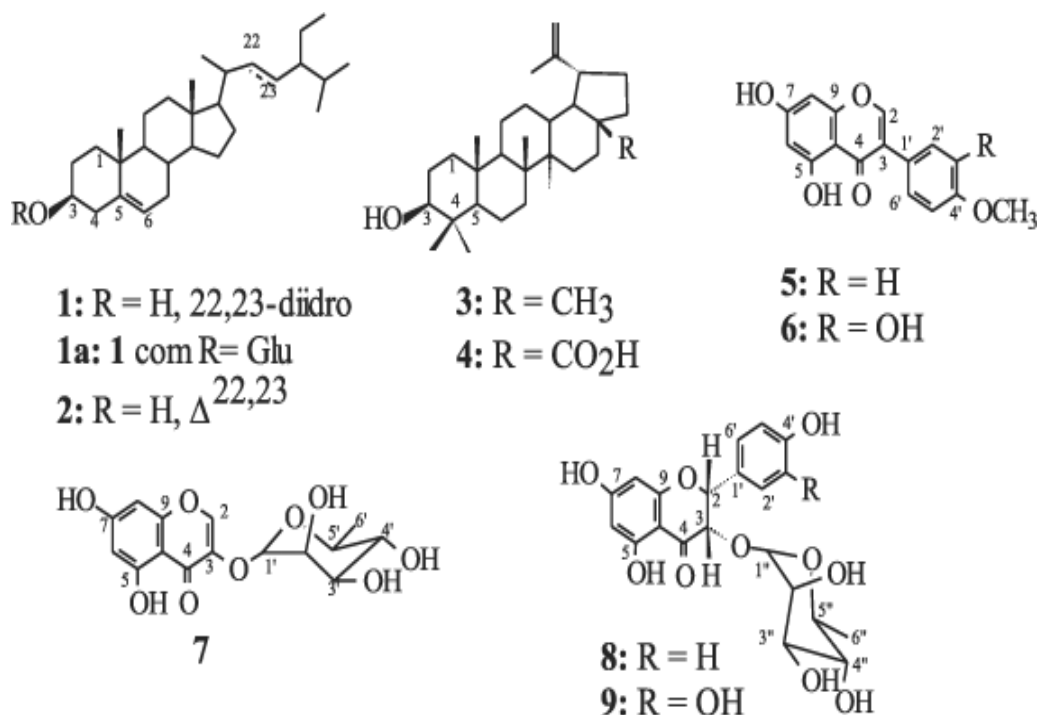
**Figura 2:** Isoflavonas isoladas de *Andira inermis*. Fonte: KRAFT et al., 2000

Kraft e colaboradores (2001) avaliaram a atividade antiplasmodial do extrato hidrofílico das folhas de *A. inermis*, mas esse se mostrou inativo *in vitro* contra *P. falciparum*. Após partições do referido extrato, a fração em clorofórmio foi ativa apresentando  $CE_{50}$  de 20,3  $\mu\text{g/mL}$ . Dessa fração foram isolados isoflavonas e 2-Arilbenzofuran-3-carbaldeídos, sendo estes ativos, Andinermal A ( $CE_{50}$  2,3  $\mu\text{g/mL}$  contra poW e 3,9  $\mu\text{g/mL}$  contra Dd2) e Andinermal C (5,9  $\mu\text{g/mL}$  [poW], 6,3  $\mu\text{g/mL}$  [Dd2]). Ainda, em 2002, Kraft e colaboradores no trabalho de isolamento bioguiado dos constituintes de *A. inermis*, isolaram a partir da fração em clorofórmio das folhas três novas substâncias que não mostraram atividade contra *P. falciparum*. Foram elas Andiol A e B e 6-hidroximetilpterocarpeno (andinermol), juntamente com o andinermal A (Figura 3).



**Figura 3:** Estruturas químicas de Andinermol A, Andinermol C, Andirol A, Andirol B e Andinermol. Fonte: KRAFT et al., 2001, 2002

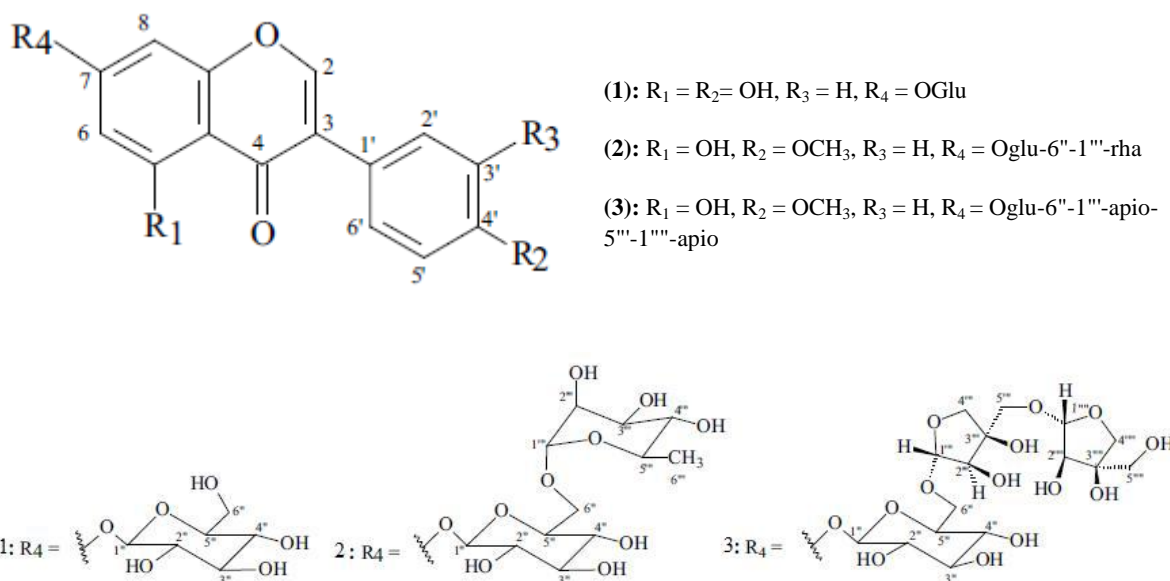
Silva e colaboradores (2006) isolaram das raízes de *Andira fraxinifolia* diversos derivados terpenoídicos e fenólicos, sendo eles: sitosterol (**1**) e estigmasterol (**2**), 3-*O*- $\beta$ -D-glicopiranosil-sitosterol (**1a**), dois triterpenos, lupeol (**3**) e ácido betulínico (**4**), duas isoflavonas, biochanina A (**5**) e pratenseína (**6**), uma cromona, eucrifina (**7**) e dois 3-*O*- $\beta$ -L-rhamnopiranosil-flavanonóis (**8** e **9**) mostrados na Figura 4.



**Figura 4:** Componentes químicos isolados das raízes de *Andira fraxinifolia*. Fonte: SILVA et al., 2006

Já em 2008, Silva e colaboradores demonstraram que o extrato metanólico e suas frações, em acetato de etila e em butanol, obtidos das raízes de *Andira anthelmia*

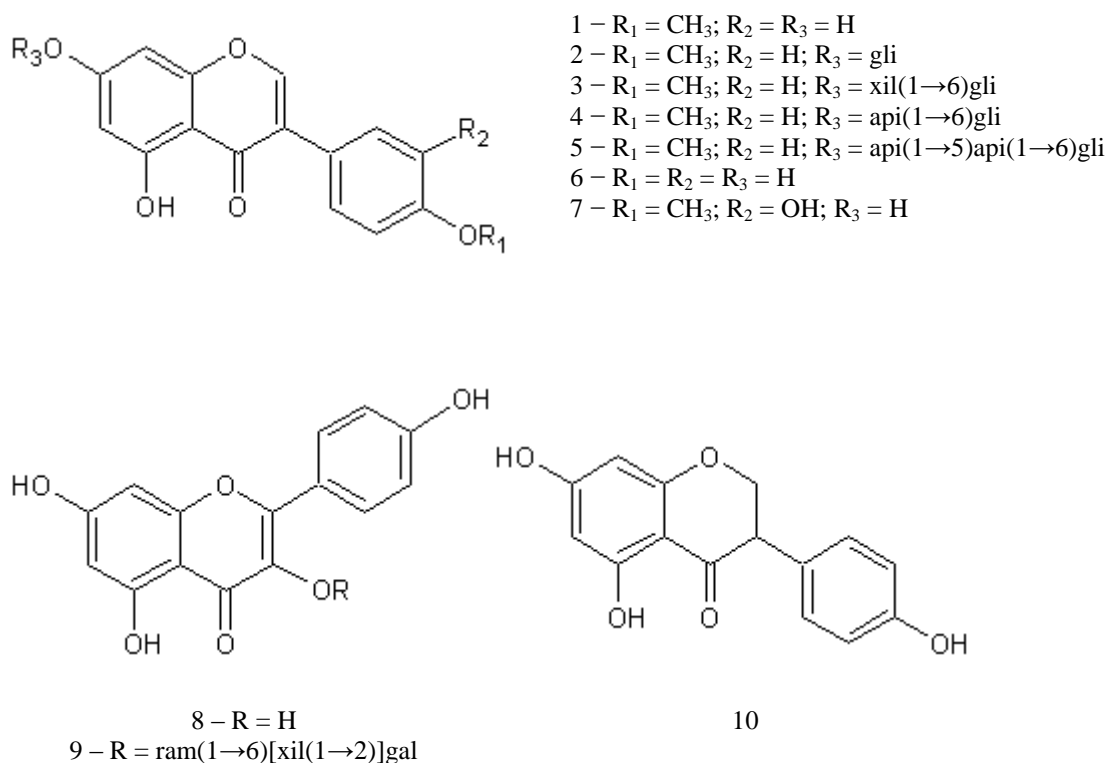
apresentaram boa atividade anti-helmíntica contra *Aspicularis tetraptera*. Das substâncias isoladas, biochanina A 7-O-β-D-glucopiranosídeo (1), biochanina A 7-O-α-L-ramnopiranosil-(1→6)-β-D-glucopiranosídeo (2) e biochanina A 7-O-β-D-apiofuranosil-(1→5)-β-D-apiofuranosil-(1→6)-β-D-glucopiranosídeo (3) mostram significativa atividade anti-helmíntica quando comparadas ao grupo controle, embora tenham sido menos ativas do que a droga de referência, o mebendazol (Figura 5).



**Figura 5:** Substâncias com atividade anti-helmíntica isoladas de *A. anthelmia*. Fonte: Adaptado de Silva et al., 2008

Garcez e colaboradores (2010), trabalhando com extrato etanólico de raízes de *Andira humilis*, conhecida popularmente como “angelim-rasteiro” e “angelim-do-campo”, isolaram diversos derivados de isoflavonas e de flavonóis (Figura 6). Da fração em hexano/clorofórmio foram obtidas as seguintes isoflavonas: biochanina A (1), genisteína (6), pratenseína (7) e diidrogenisteína (10). Da fração  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$  foram isolados: biochanina A, biochanina A 7-O-β-D-glicopiranosídeo (2), biochanina A 7-O-β-D-xilopiranosil-(1→6)-β-D-glicopiranosídeo (3), biochanina A 7-O-β-D-apiofuranosil-(1→6)-β-D-glucopiranosídeo (4), biochanina A 7-O-β-D-apiofuranosil-(1→5)-β-D-apiofuranosil-(1→6)-β-D-glicopiranosídeo (5), Canferol (8), Canferol 3-O-α-L-ramnopiranosil-(1→6)-[β-D-xilopiranosil-(1→2)]-β-D-galactopiranosídeo (9).





**Figura 6:** Estruturas químicas dos flavonoides e isoflavonoides isolados das raízes de *A. humilis*. Fonte: GARCÉZ et al., 2010

Como a biochanina A foi a única isoflavona encontrada em todas as seis espécies de *Andira* estudadas até o momento, independente da parte da planta estudada (COCKER et al., 1962; BRAZ-FILHO et al., 1973; KRAFT et al., 2000; SILVA et al., 2006, 2008; ALMEIDA et al., 2008), ela provavelmente pode ser considerada como o marcador quimiosistemático do gênero (GARCEZ et al., 2010).

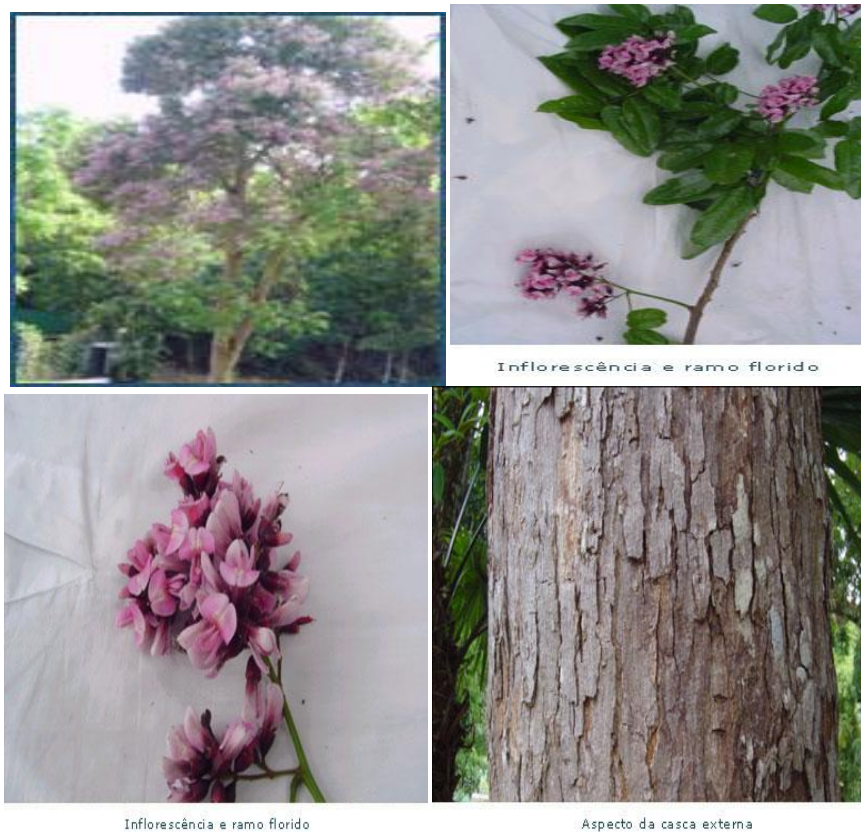
## 2.2. *Andira nitida* Mart. ex Benth.

*Andira nitida* é uma espécie ainda carente de estudos científicos, sendo popularmente conhecida por "angelim", pertencente à família Fabaceae. Botanicamente a espécie é descrita como sendo uma árvore com até 8m de altura, com ramos lisos quase glabros. Folíolos 5-9 medindo de 5-9,5 cm de comprimento por 2,5 - 5,2 em de largura, de base subcordada ou arredondada, ovado-oblongos, acuminados, coriáceos, glabros ou glabérrimas, brilhantes; nervura principal impressa na face superior e saliente na inferior, nervuras secundárias delgadas e salientes nas duas faces. Estipelas diminutas. Panículas pequenas, laxas. Flores roxas com 9 mm de comprimento. Cálice urceolado-campanulado, curto, escuro, glabro, às vezes, com pelos esparsos. Corola quase 3 vezes o tamanho do cálice e ovário glabro ou

esparso-piloso (MATTOS, 1979). A casca morta é marrom escura, fosca, escamosa em placas delgadas, com facilidade de destacamento. A casca viva é amarelada com suave odor característico (lembrando feijão verde) (Figura 7). O fruto do Angelim é uma drupa, apesar de ser uma leguminosa (que, usualmente, têm os frutos do tipo legume ou vagem). Os frutos são muito apreciados pelos morcegos, que se encarregam da dispersão da espécie, e as sementes têm germinação fácil (AGÊNCIA ESTADUAL DE MEIO AMBIENTE).

Por suas características botânicas, Martins e Biondi (1990) sugeriram a introdução da espécie tanto para o uso em arborização de ruas quanto para áreas verdes, compatibilizando as características botânicas da espécie com as do local.

Geograficamente, distribui-se desde Espírito Santo a Bahia, Pernambuco e Ceará (MATTOS, 1979). De acordo com Lewis (1987), sua região de ocorrência natural é caracteristicamente de restinga e transição de campo natural.

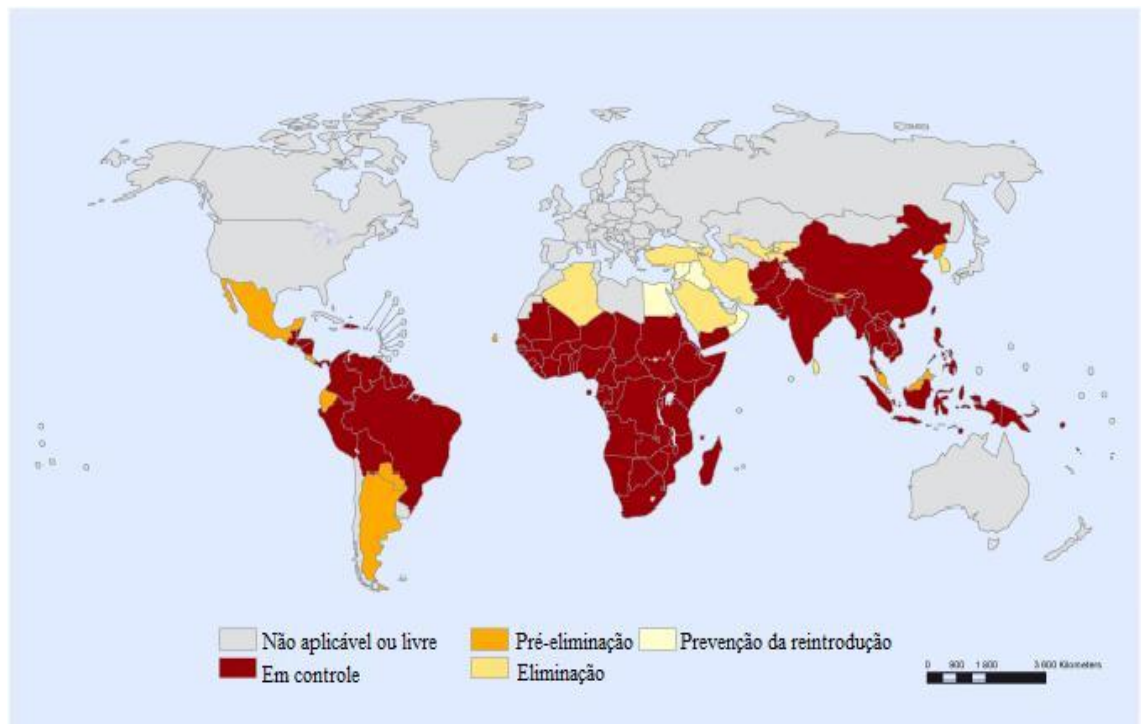


**Figura 7:** Coleção botânica de *A. nitida*. Fonte: AGÊNCIA ESTADUAL DE MEIO AMBIENTE  
<http://www.cprh.pe.gov.br/rbma/ctudo-arvores-mata-angelim.asp>

### 2.3. Malária

A malária humana é uma enfermidade milenar, sendo uma das maiores prioridades da Organização Mundial de Saúde (OMS). Nos países tropicais (África, Ásia e América) a malária ainda é causa comum de mortes, sendo endêmica em cerca de 99 países. Estima-se que, em 2011, cerca de 219 milhões de pessoas foram acometidas de malária e 660 mil morreram, sendo a África e a América Latina e Central os de maiores ocorrências (WHO, 2012).

Em 2012, havia 99 países e territórios com a transmissão da malária em curso e cinco países na prevenção da fase de reintrodução, perfazendo um total de 104 países e territórios em que a malária é atualmente considerada endêmica (Figura 8). Globalmente, cerca de 3,3 bilhões de pessoas estavam em risco de contrair malária em 2011, com as populações que vivem na África-Subsaariana sob o maior risco de infecção (WHO, 2013).



**Figura 8:** Classificação dos países pelo estágio de eliminação da malária, dezembro de 2012. Fonte: WHO, 2013

Essa patologia representa um grave problema, não só em termos de saúde pública, mas também em relação ao desenvolvimento cultural e socioeconômico das regiões tropicais e subtropicais do planeta. A malária é a principal causa de mortalidade infantil na África, sendo também responsável por 10% dos casos de mortalidade geral da população africana e consumindo cerca de 40% das despesas com saúde pública neste continente (VALE et al., 2005).

No Brasil, o controle da malária ainda não é autossustentável. O Programa Nacional de Controle da Malária vem concentrando esforços para a participação e compartilhamento de responsabilidades dos três níveis federativos (Federal, Estadual e Municipal) no que se refere ao planejamento, organização e execução das medidas de controle da malária. O controle da malária depende basicamente do tratamento dos pacientes, o qual é dificultado pela presença de casos de malária causados pelo *Plasmodium falciparum* multirresistente aos diversos antimaláricos disponíveis (ROSENTHAL & MILLER, 2001; FIDOCK et al., 2004).

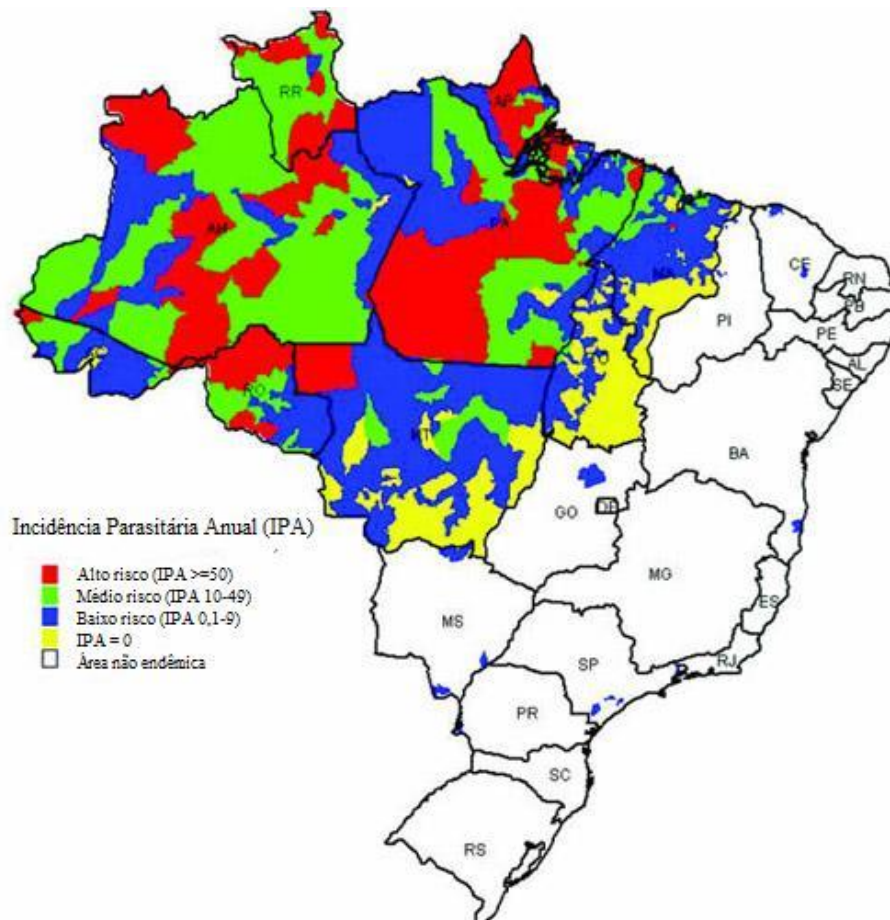
As principais manifestações clínicas da malária podem incluir picos de febre elevada, calafrios, prostração, cefaleia, mialgia e anemia. As infecções pelo *P. falciparum* não tratadas, no indivíduo não imune (como crianças, adultos jovens, grávidas, migrantes de área não endêmicas), podem evoluir para malária grave, frequentemente letal. A malária grave pode levar a acidose metabólica, delírio, falência múltipla dos órgãos, com acometimento do sistema nervoso central como resultado de uma resposta inflamatória e do bloqueio de capilares com hemácias parasitadas, resultando em convulsões e elevada mortalidade. Por isso é denominada de terçã maligna (FIDOCK et al., 2004).

#### **2.4. Ocorrência da malária**

Nas Américas, as zonas de maior transmissão/infecção são três: uma ao norte do planalto mexicano, tendo como principais vetores os mosquitos *Anopheles quadrimaculatus* e *Anopheles pseudopunctipennis*; outra abrangendo toda a América Central e Antilhas até a costa norte da Colômbia e Venezuela, tendo como principal vetor *Anopheles albimanus* e por último grande parte do Continente Sul-Americano, tendo como principal transmissor o *Anopheles darlingi* (REY, 2001).

O Brasil, na América, é o país com o maior número de casos, compreendendo cerca de 50% do total registrado. O território brasileiro é dividido em duas regiões com relação à malária: a área endêmica é a chamada Amazônia Legal, que inclui os estados do Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins, e região não endêmica, formada pelos demais estados (Figura 9). Um aumento no número de casos começou na década de 1980, atingindo um pico de 540.047 casos em 1999, após uma diminuição gradual para 379.500 casos notificados em 2002. Em 2002, aproximadamente 40% do número total de casos de malária nas Américas foram registrados no Brasil, quase todos (99,5%) na região endêmica, sendo que o estado do Pará apresentava, na época, o maior número de casos (149.088). Entretanto, no período de 2002-2006, o número de casos diminuiu no estado do Pará e aumentou significativamente no estado do Amazonas, atingindo

223.892 casos em 2005 (BRASIL, 2007). A intensa migração para as áreas de agricultura e de mineração na Amazônia Legal, associado com inapropriadas condições de vida e dos serviços de saúde, são fatores limitantes para a cobertura de intervenções eficazes no controle da doença, também relacionada com a falta de recursos (humanos e outros) e deficiências técnica e gerencial local (CHAVES & RODRIGUES, 2000). Os casos de malária aumentaram novamente durante o período de 2003-2005, com um total de 603.532 casos em 2005 (BRASIL, 2007). Porém, os números de notificações voltaram a cair nos anos de 2007 e de 2008 com registros de 457.466 e 314.420 casos, respectivamente (BRASIL, 2009).



**Figura 9:** Mapa do Risco de Transmissão pela Incidência Parasitária Anual (IPA) da Malária no Brasil.

Fonte: FIOCRUZ, 2013. (<http://www.fiocruz.br/ccs/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=1278&sid=9>)

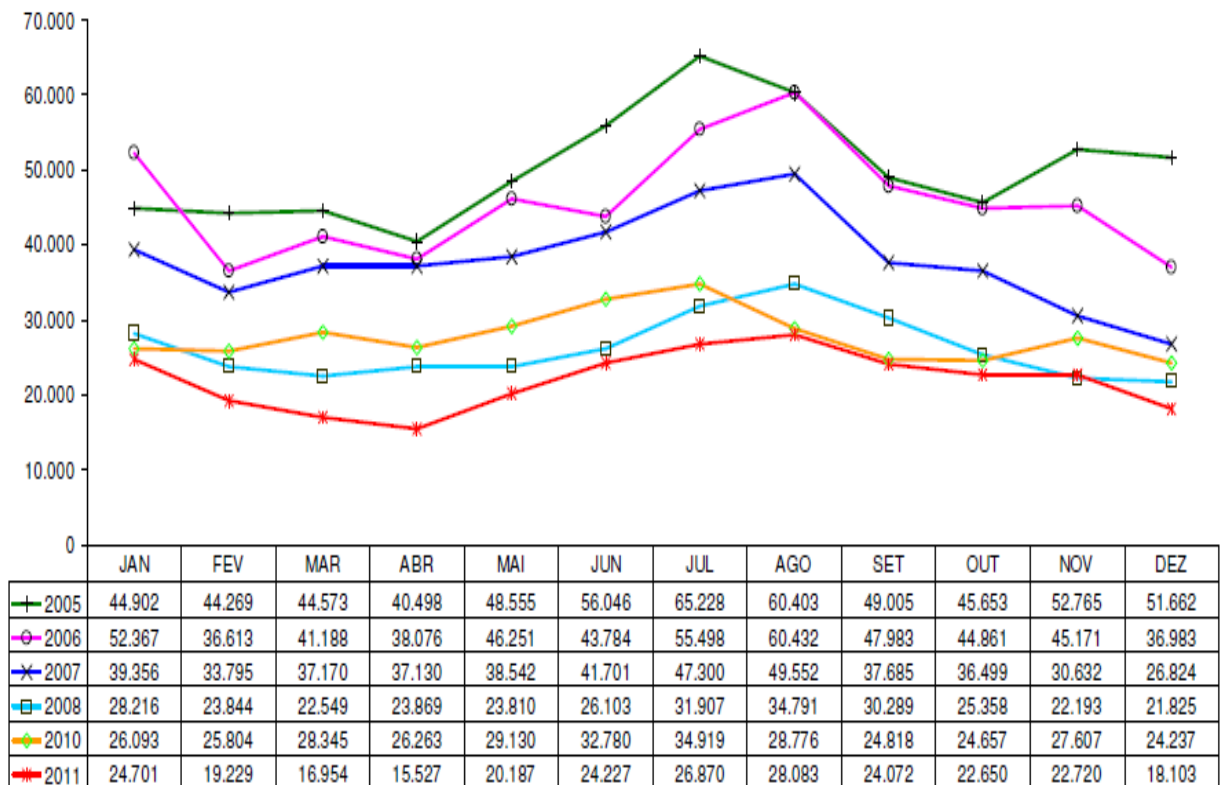
Na região da Amazônia Legal foram identificados 90 municípios com um Índice Parasitário Anual (IPA) igual ou maior do que 50 casos por 1000 habitantes (BRASIL, 2009).

Alguns fatores parecem favorecer a transmissão da malária na Região da Bacia Amazônica e que também dificultam a aplicação das medidas tradicionais de controle. Entre os primeiros estão os fatores biológicos, como a presença de altas densidades de mosquitos vetores, a presença de população migrante sem imunidade adquirida naturalmente contra a

doença e a prevalência de cepas de *Plasmodium falciparum* resistentes a medicamentos antimaláricos de uso seguro em campo. Também se destacam os fatores geográficos, como a baixa altitude predominante, as altas temperaturas, a elevada umidade relativa do ar, os altos índices pluviométricos e a cobertura vegetal do tipo florestal, favoráveis à proliferação de vetores; além dos ecológicos como desmatamentos, afastando animais nos quais os mosquitos se alimentavam, alternativamente à alimentação em seres humanos e a construção de hidroelétricas e de sistemas de irrigação, aumentando o número de criadouros de mosquitos (PÓVOA et al., 2000).

A região amazônica é bem distinta do restante do país; a sua ocupação forçada, principalmente pelo garimpo, introduziu fatores de controle difícil pelo trânsito intenso de indivíduos dentro da região e fora dela; surgiram casos de resistência tanto ao DDT por parte de anofelinos como para a cloroquina por parte dos plasmódios. Essa conjugação de fatores levou a novo aumento da incidência da doença no país que chegou a um ponto extremo em 1999, com grande aumento do número de casos. Surge então o Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária na Região Amazônica (PIACM). Este Plano vigorou entre julho de 2000 e dezembro de 2002. No final de 2001 houve redução em 40% dos casos quando comparados a 1999, diminuição em 70% no número de internações e, conseqüentemente, redução de 36,5% no número de óbitos por malária. A ação foi mais eficaz no Amazonas e Acre, e com menor impacto em Rondônia e Amapá (LOTUFO, 2008).

No ano de 2011, foram registrados no Brasil mais de 267.045 casos de malária, sendo a espécie *Plasmodium vivax* de maior incidência (WHO, 2012). O período compreendido entre 2005 a 2011 mostra uma diminuição acentuada dos casos de malária na Amazônia Legal, apesar disso a incidência da doença ainda é expressiva com cerca de 20 mil casos ao mês no último ano (Figura 10).



**Figura 10:** Registro mensal de casos de malária. Amazônia Legal 2005 a 2011. Fonte: BRASIL, 2011.

No ano de 2010 os maiores números de casos foram encontrados no Pará, seguido por Amazonas e Roraima. Em 2011 houve uma queda significativa, mas a situação na região ainda é alarmante. Outros estados que compõem a região possuem menor incidência como Mato Grosso, Maranhão e Tocantins (Tabela 1) (BRASIL, 2011).



**Tabela 1:** Dados epidemiológicos de malária, por estado. Amazônia Legal, janeiro a dezembro de 2010 e 2011.

UF	Total de casos		% de variação de casos	% por UF 2011	Casos de falciparum +(f,v)		% de variação de falcip.	% Falciparum		Internação		% variação de internação
	2010	2011			2010	2011		2010	2011	2010	2011	
AM	74.135	59.279	-20,0	22,5	9.526	4.799	-49,6	12,8	8,1	523	535	2,3
PA	135.246	113.461	-16,1	43,1	23.745	16.822	-29,2	17,6	14,8	1.794	2.012	12,2
RO	43.576	30.371	-30,3	11,5	4.688	2.177	-53,6	10,8	7,2	905	660	-27,1
<b>Estrato 1</b>	252.957	203.111	-19,7	77,1	37.959	23.798	-37,3	15,0	11,7	3.222	3.207	-0,5
AC	36.905	22.584	-38,8	8,6	5.167	3.321	-35,7	14,0	14,7	756	386	-48,9
AP	15.388	18.437	19,8	7,0	3.229	4.482	38,8	21,0	24,3	181	246	35,9
RR	21.806	13.982	-35,9	5,3	2.879	2.142	-25,6	13,2	15,3	474	319	-32,7
<b>Estrato 2</b>	74.099	55.003	-25,8	20,9	11.275	9.945	-11,8	15,2	18,1	1.411	951	-32,6
MT	2.365	1.630	-31,1	0,6	524	379	-27,7	22,2	23,3	174	123	-29,3
MA	3.904	3.503	-10,3	1,3	904	450	-50,2	23,2	12,8	189	87	-54,0
TO	104	76	-26,9	0,0	15	15	0,0	14,4	19,7	60	26	-56,7
<b>Estrato 3</b>	6.373	5.209	-18,3	2,0	1.443	844	-41,5	22,6	16,2	423	236	-44,2
<b>Amazônia</b>	333.429	263.323	-21,0	100	50.677	34.58	-31,8	15,2	13,1	5.058	4.394	-13,1

AM: Amazonas, PA: Pará, RO: Rondônia, AC: Acre, AP: Amapá, RR: Roraima, MT: Mato Grosso, MA: Maranhão, TO: Tocantins. Fonte: BRASIL, 2011

## 2.5. Agentes Etiológicos e Ciclo Biológico

A malária é transmitida pela fêmea do mosquito *Anopheles* ao hospedeiro humano. Existe um total de 54 espécies de anofelinos pertencentes a cinco subgêneros de *Anopheles* Meigen (*Nyssorhynchus*, *Kerteszia*, *Stethomyia*, *Lophopodomyia*, *Anopheles*) registrados no Brasil. As espécies de anofelinos relatadas como vetoras no país pertencem ao subgênero *Nyssorhynchus* e *Kerteszia* (CONSOLI & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).

A malária humana é causada por cinco espécies de parasitos: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* e *Plasmodium ovale*. Recentemente, *P. knowlesi*,

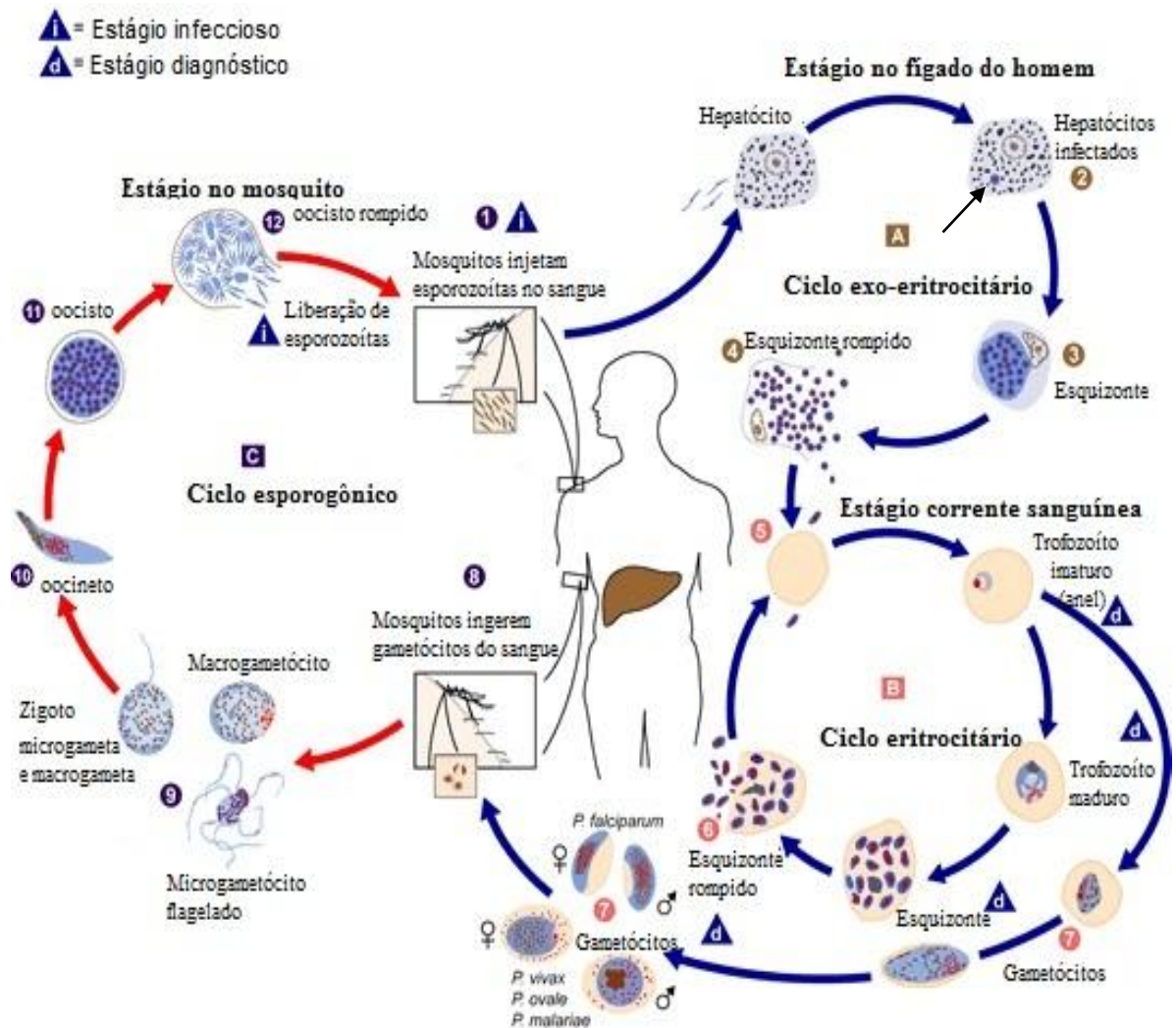


uma espécie encontrada naturalmente no macaco de cauda longa (*Macaca fascicularis*) e no macaco cauda de porco (*Macaca nemestrina*), foi comprovada como capaz de causar infecção em seres humanos. A infecção por *P. knowlesi* é predominante no Sudeste Asiático. Casos importados foram relatados em países da Europa, devido ao ecoturismo para a região africana (LEE et al., 2013).

Das três espécies que ocorrem no Brasil, o *Plasmodium falciparum* é o mais letal e o *P. vivax* o mais comum atualmente (ambos causam a chamada febre terçã); o *P. malariae*, de baixa prevalência, causa a febre quartã. Já o *P. ovale* ocorre apenas na África.

O ciclo do parasito se desenvolve em dois hospedeiros, no homem e no mosquito *Anopheles* (Figura 11). No homem, o ciclo biológico inicia-se com a picada do mosquito infectado na pele humana, injetando os esporozoítos do parasito na corrente sanguínea. Os esporozoítos do *Plasmodium* invadem os hepatócitos e ali se multiplicam por divisão assexuada, resultando na produção de milhares de merozoítos (ciclo pré-eritrocítico). Estas células são rompidas e o parasito cai na corrente sanguínea, parasitando subsequentemente os eritrócitos (ciclo eritrocítico). Dentro dos eritrócitos, inicia-se uma nova fase de reprodução assexuada, em ciclos de 36, 48 ou 72 horas. O parasito se desenvolve nas formas de trofozoítos e esquizontes para, numa fase seguinte, cada esquizonte se dividir em merozoítos eritrocíticos, que são liberados na corrente sanguínea com a lise das hemácias. A destruição cíclica dos eritrócitos e liberação do pigmento malárico (hemozoína) conduzem aos ataques febris (VALE et al., 2005.; SILVA et al., 2005).

Em um processo induzido pelo estresse, uma pequena parte dos merozoítos sanguíneos sofre diferenciação em gametócitos feminino (macrogametócito) e masculino (microgametócito), que são transmitidos ao mosquito quando este pica um indivíduo infectado. No interior do intestino do mosquito, os gametócitos femininos amadurecem em macrogametas e os masculinos se dividem em 4 a 8 microgametas flagelados, dando-se início a reprodução sexuada do parasito. Estes gametas femininos e masculinos fundem-se e formam zigotos, os quais se transformam em oocinetos móveis e estes penetram a parede no intestino médio do inseto, localizando-se na camada epitelial sob a forma de oocistos. A divisão assexuada dentro destes oocistos produz milhares de esporozoítas que serão liberados quando ocorre a ruptura do oocisto, migrando para as glândulas salivares do mosquito. Dessa forma, pode-se iniciar um novo ciclo de transmissão ao hospedeiro humano (VALE, 2005; DAILY, 2006; KATSURAGAWA et al., 2008; NEVES, 2011).



**Figura 11:** Ciclo biológico do *Plasmodium* sp. Fonte: Adaptado de CDC, 2006.

Nos casos de infecção por *P. falciparum*, após a invasão dos eritrócitos, não restam formas hepáticas do parasito. No caso do *P. vivax* e do *P. ovale*, algumas formas quiescentes ficam alojadas no fígado, denominadas de hipnozoítas. Estas formas podem meses mais tarde, ativar-se, multiplicar-se e dar origem a novo ciclo de infecção eritrocítica, que é conhecida como recaída tardia (KATSURAGAWA et al, 2008).

Durante a fase eritrocítica, o parasito utiliza a hemoglobina do hospedeiro como fonte de aminoácidos, destruindo aproximadamente 75 - 80% da hemoglobina dos eritrócitos. Os parasitos necessitam de nutrientes externos e por terem capacidade limitada de sintetizar aminoácidos e fontes destes, suprem suas necessidades metabólicas pela digestão da

hemoglobina da célula hospedeira. O processo origina aminoácidos livres indispensáveis a sua sobrevivência (OLLIARO & YUTHAVONG, 1999).

## 2.6. Terapia da malária

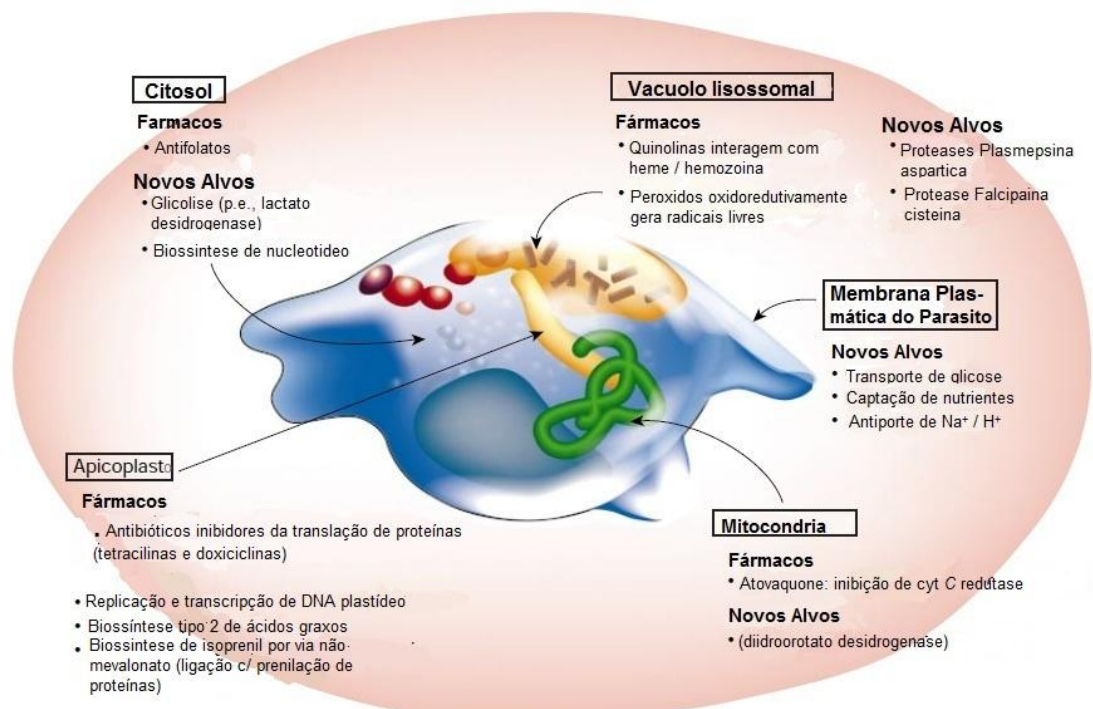
A escolha do tratamento para os pacientes com malária deve levar em conta alguns fatores como: o grau da infecção, gestantes, a idade, a espécie de plasmódio e a gravidade do caso. Os antimaláricos distribuídos atualmente pelo Ministério da Saúde para uso rotineiro são: Quinina 500 mg do sal, Cloroquina 150 mg, Artemeter 20 mg + Lumefantrina 120 mg, Artesunato 25 mg + Mefloquina 50 mg (infantil), Artesunato 100 mg + Mefloquina 200 mg (adulto), Clindamicina 300 mg, Doxiciclina 100 mg do sal, Primaquina 5 mg (infantil) e 15 mg (adulto) (BRASIL, 2010).

A grande complexidade do ciclo de vida do parasito explica, em parte, as enormes dificuldades para o estabelecimento de uma terapia antimalárica eficaz e segura. O desenvolvimento de um fármaco antimalárico ideal pressupõe a existência de uma atividade antiparasitária ótima, com atuação do medicamento nos estágios hepáticos e sanguíneos, com um mínimo de efeitos adversos para o hospedeiro. O custo também é um fator importante a ser considerado. A tendência atual é o uso da terapia combinada, ou seja, a combinação de substâncias que atuem em diferentes estágios do ciclo biológico do parasito (FATTORUSSO & TAGLIALATELA-SCAFATI, 2009).

Os alvos dos fármacos antimaláricos são formas evolutivas específicas do ciclo de vida do parasito. De acordo com esses alvos os fármacos são classificados em:

- Esquizonticidas teciduais: Aqueles que atuam sobre o ciclo esquizogônico hepático, destruindo os parasitos durante o ciclo pré-eritrocítico, interrompendo a fase sanguínea e, portanto, as manifestações clínicas da doença. São aplicados na fase pré-patente da infecção natural pelo *P. vivax*. Impedem as recaídas e são chamados antirrecidivas.
- Esquizonticidas sanguíneos: Exercem ação sobre os parasitos durante o ciclo esquizogônico eritrocítico, promovendo a cura clínica da doença.
- Gametocitocidas: Sua ação se dá pela destruição dos macro e microgametócitos na circulação sanguínea, evitando a infecção do mosquito.
- Ação esporonticida: Drogas que atuam sobre os gametócitos sem destruí-los, mas impedindo que possam evoluir a esporozoítos no estômago do mosquito.

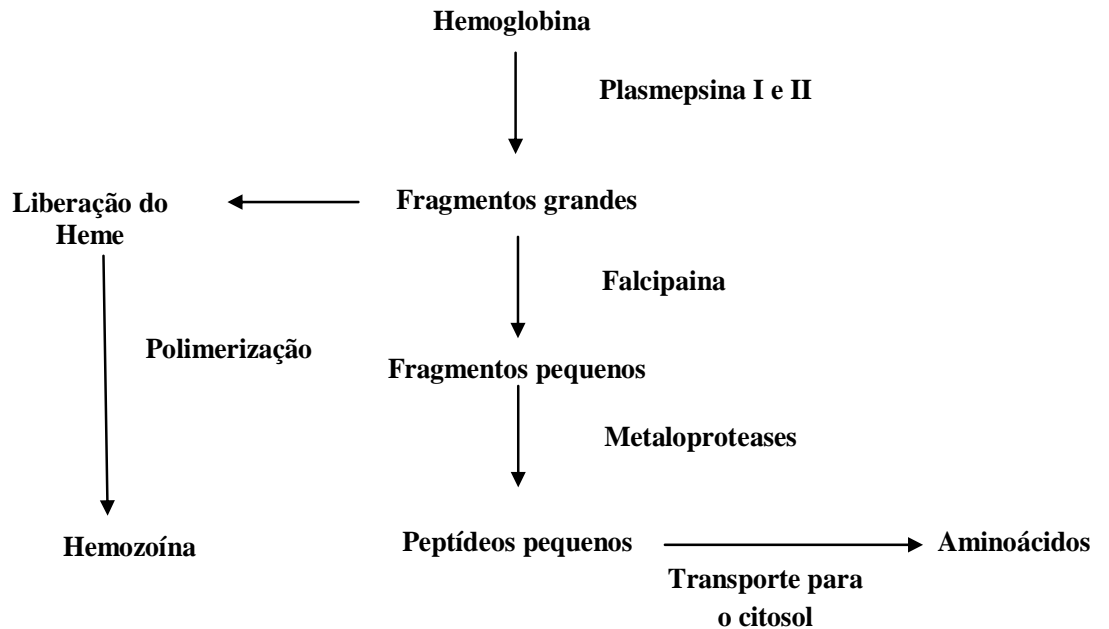
A terapia da malária visa atingir pontos-chaves do ciclo evolutivo do parasito (Figura 12). As proteinases vacuolares do plasmódio podem ser validadas como alvos terapêuticos, para o desenvolvimento de novos protótipos de fármacos antimaláricos. A polimerização do heme é um importante alvo de ação de fármacos antimaláricos tradicionais, como a cloroquina e quinina, uma vez que o produto heme resultante do metabolismo da hemoglobina quando não detoxificado pode resultar em danos às membranas e enzimas biológicas dos parasitos dentro dos eritrócitos (FATTORUSSO & TAGLIALATELA-SCAFATI, 2009).



**Figura 12:** Sítios de ação dos fármacos antimaláricos e novos alvos no parasito. Fonte: Adaptado de RIDLEY, 2002.

Entre as várias rotas possíveis, o sequestro do heme via biocristalização em hemozoína, parece ser o mais importante mecanismo de detoxificação do heme pelo parasito. A hemoglobina é importada para dentro do vacúolo digestivo (Figura 13), um compartimento ácido, onde é metabolizada por enzimas proteolíticas (plasmepsinas - proteases aspárticas), falcipaina (protease de cisteína) e peptidases (p.e., metalopeptidase) em peptídeos que, posteriormente, são reduzidos a aminoácidos. Isto resulta na liberação de grandes quantidades de heme-Fe (II), ferriprotoporfirina IX, que é rapidamente oxidado a Fe (III)-hematina. O resíduo livre do heme, devido ao seu alto potencial oxidativo, é altamente tóxico. Assim, para sua proteção, o parasito promove sua polimerização, resultando em um derivado inerte, insolúvel e não tóxico a ele, o chamado pigmento malárico ou hemozoína (uma rede

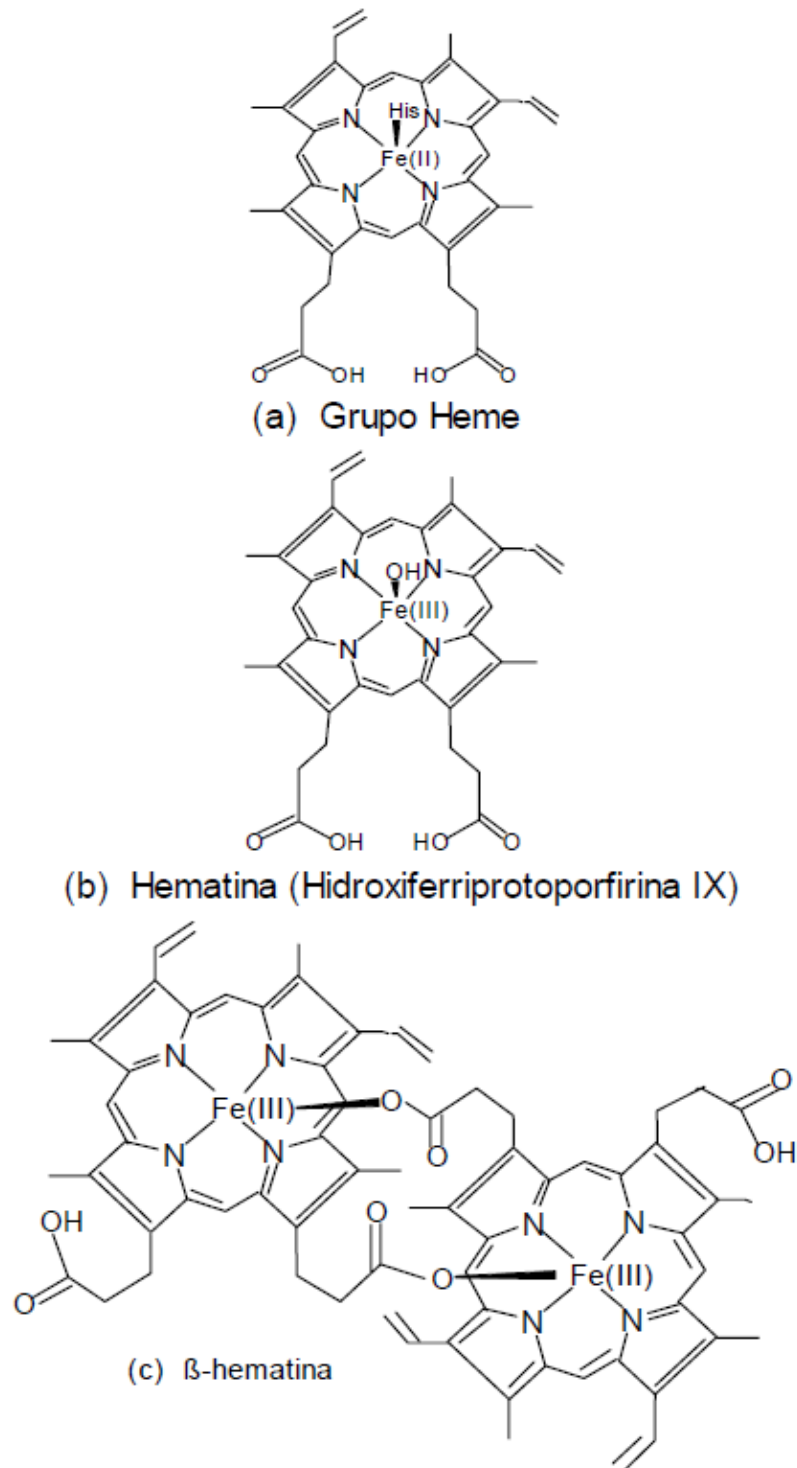
estruturada de dímeros de heme agregados). Esse processo parece essencial para a sobrevivência do parasito, em contraste com outras vias metabólicas, pois este parece ter dificuldade em utilizar processos alternativos para metabolizar a hemoglobina e fazer a detoxificação do grupo heme (RIDLEY, 2002).



**Figura 13:** Via catabólica de degradação da hemoglobina dentro do vacúolo digestivo de *P. falciparum*.

Fonte: Adaptado de ZIGLER et al., 2001

Durante o processo de degradação da hemoglobina, todo o heme é liberado para o vacúolo digestivo para ser polimerizado à hemozoína (pigmento malárico). O ferro é oxidado do estado Fe (II) a Fe (III) formando hematina por um mecanismo que ainda não foi totalmente elucidado, mas presume-se que  $O_2$  atue como o oxidante. Neste processo, acredita-se que grandes quantidades de ânion superóxido ( $O_2^-$ ) são gerados e, como o pH do vacúolo é ácido, acontece a formação de  $O_2$  e  $H_2O_2$ , espontaneamente, deixando o parasito com o problema de eliminação do  $H_2O_2$ . Foi ainda sugerido que a atividade da catalase elimina  $H_2O_2$ , formando  $H_2O$  e  $O_2$  (ATAMMA & GINSBURG, 1993). O parasito elimina o heme, pelo menos em parte, produzindo uma substância altamente insolúvel conhecida como hemozoína/ $\beta$ -hematina que é quimicamente e estruturalmente idêntica ao produto sintético ferriprotoporfirina IX (Fe (III) PPIX) (GARAVITO et al., 2002). As estruturas químicas do grupo heme, hematina e  $\beta$ -hematina estão dispostas na Figura 14.

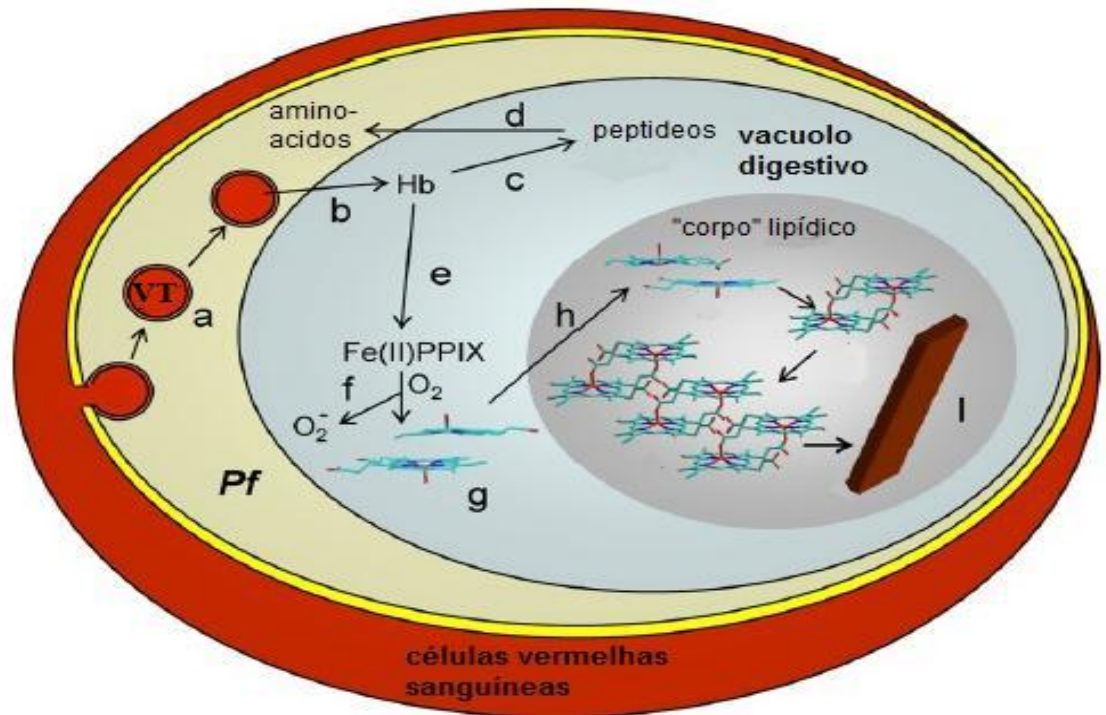


**Figura 14:** Estrutura química de (a) grupo heme, (b) hematina e (c)  $\beta$ -hematina. Fonte: GARAVITO et al., 2002.

Nos últimos anos muitos esforços têm sido feitos e grandes avanços alcançados na descoberta do mecanismo de formação da hemozoína. A observação de que a formação de hemozoína no *P. falciparum* ocorre dentro de corpos lipídicos (Figura 15) revolucionou o



ponto de vista da sua biossíntese, mudando a ideia sobre o processo a partir de uma solução aquosa para um ambiente não-aquoso (EGAN, 2008).



**Figura 15:** Proposta de formação do cristal de hemozoína, feita por Egan 2008. a) *Pf*: *Plasmodium falciparum*, VT: vesícula transportadora, Hb: hemoglobina. b) hemoglobina é transportada para dentro do vacúolo digestivo (VD), sendo (c) metabolizada a peptídeos que serão exportados (d) do VD, metabolizados a aminoácidos que serão utilizados pelo parasito. O heme (Fe(II)PPIX) liberado pela Hb (e) é oxidado (f) a Fe(III)PPIX e ânion superóxido ( $O_2^-$ ). O (Fe(III)PPIX) forma um dímero (g) que é 'incorporado' (h) em um 'corpo' lipídico, onde finalmente forma-se (I) o cristal de hemozoína.

A sobrevivência do plasmódio está diretamente relacionada a produção de energia através da glicólise, mas não ocorre incorporação do piruvato no ciclo de Krebs e, portanto, o produto final é o lactato. Assim, a enzima lactato desidrogenase (LDH) catalisa a redução do piruvato a lactato, permitindo a produção de energia necessária ao crescimento do parasito, com liberação de grandes quantidades de lactato, que pode contribuir para a acidose láctica observada em casos de malária severa. Desta forma, a LDH representa um importante alvo terapêutico. O parasito depende das purinas do hospedeiro, para a síntese do ácido nucléico e para a produção de energia, podendo esta via ser explorada para o ataque quimioterapêutico. Quatro enzimas desta via biossintética são alvos antimaláricos tradicionais: a dihidropteroato sintase (DHPS), a 2-amino-4-pirófosfoquinase (PPPK), a hidróxi-6-metil-dihidropteridina (DHFR) e a timidilato sintase (TS). (OLLIARO & YUTHAVONG, 1999).

O transporte de elétron mitocondrial é fundamental para a sobrevivência do parasito, sendo um alvo potencial na quimioterapia da malária. Enzimas mitocondriais ligadas a cadeia de transporte de elétrons, como a dihidro-ototato desidrogenase (DHODase), pode ser um alvo da inibição de determinados fármacos antimaláricos (CUNICO et al., 2008.). Ainda, os parasitos intraeritrocitários acarretam profundas alterações na membrana dos eritrócitos infectados, permitindo aumento na permeabilidade dos nutrientes provenientes do ambiente extracelular, dentre outros processos. Teoricamente, é possível usar tal sistema de transporte para facilitar a entrada seletiva de antimaláricos nos eritrócitos infectados ou impedir que nutrientes-chaves sejam interiorizados (OLLIARO & YUTHAVONG, 1999).

A maioria dos antimaláricos não apresenta efeito sobre a fase hepática do parasito, no entanto, como esta fase é necessária para estabelecer a infecção e inicialmente gera uma carga baixa de parasitos, pode servir como um excelente alvo em potencial. Apenas a primaquina está disponível para a eliminação de hipnozoítas. Há um maior número de fármacos que eliminam as formas assexuadas na fase eritrocitária, que têm como alvo o metabolismo do parasito e a desintoxicação do heme (cloroquina, amodiaquina, quinina, mefloquina, halofantrina, e lumefantrina), antifolatos (sulfadoxina-pirimetamina e dapsona), e as mitocôndrias (atovaquona). A ATPase-Ca<sup>2+</sup> do retículo sarco / endoplasmático (SERCA) é cogitada como um possível alvo dos derivados da artemisinina (ECKSTEIN-LUDWIG et al., 2003).

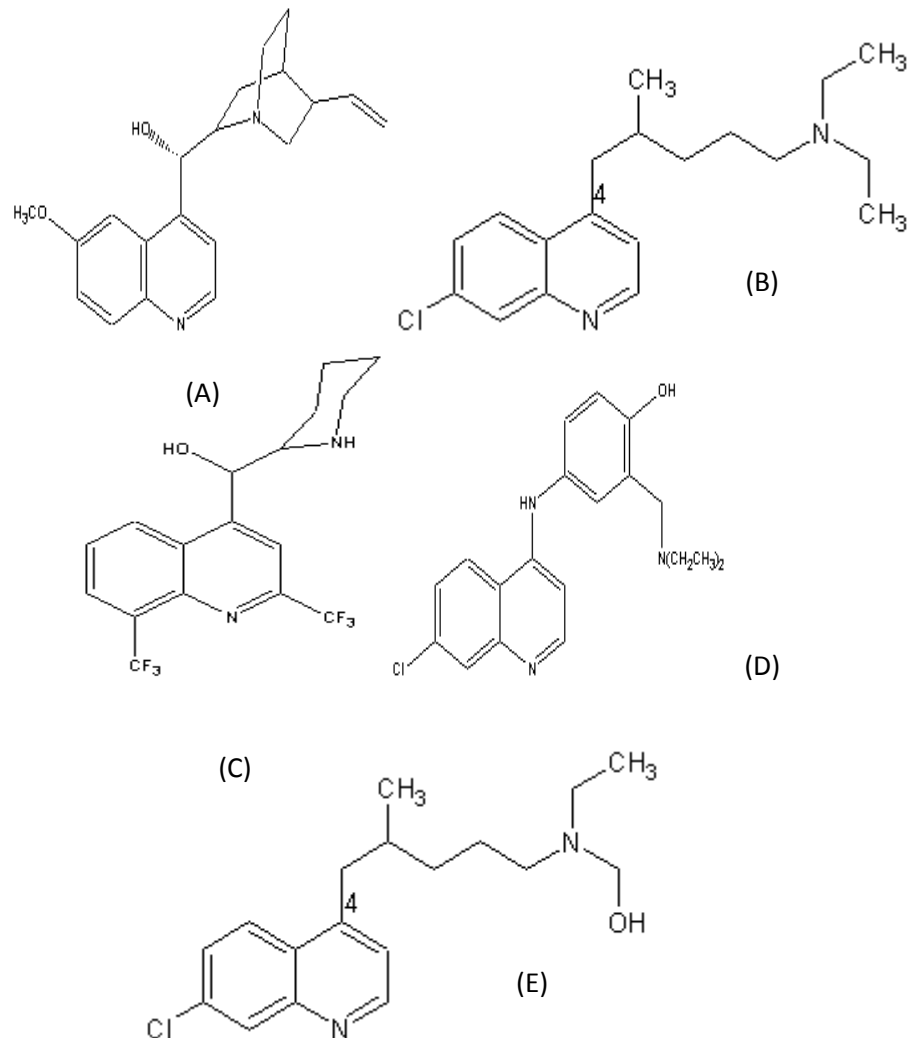
A quinina é um alcaloide, que foi isolado pela primeira vez da casca da árvore tropical *Cinchona ledgeriana* em 1820, e serviu como precursor dos derivados 4- e 8-aminoquinolínicos e dos álcoois quinolínicos. É rápida e quase completamente absorvida a partir do trato gastrointestinal e o pico de concentração plasmática ocorre entre 1-3 horas após a administração oral do sulfato ou bissulfato, podendo ser administrado por via intravenosa (IV) ou intramuscular (IM) (FRANÇA et al., 2008).

Dos derivados 4-aminoquinolínicos, a cloroquina (7-cloro-4(4-dietilamino-1-metilbutilamino)-quinolina) é um quimioterápico indispensável por ser um potente esquizonticida sanguíneo, gametocitocida (contra *P. vivax*), além de possuir ação antipirética e antiinflamatória. No entanto, não é ativa contra esporozoítos ou hipnozoítos (O'NEILL et al., 1998; SULLIVAN et al., 2002). A cloroquina é quase completamente absorvida quando tomada por via oral, além de ser um medicamento barato, bem tolerado, estando disponível IM e IV. É uma base fraca anfifílica que atua ao acumular-se no vacúolo alimentar do parasito. O parasito atua polimerizando os metabólitos tóxicos da proteólise da hemoglobina e



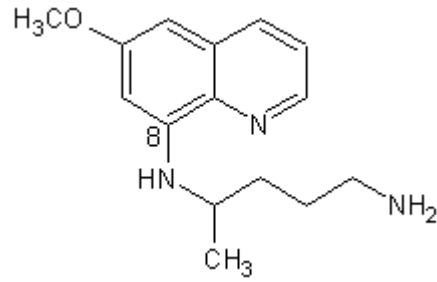
a cloroquina interfere com este processo, impede a formação de hemozoína, resultando na morte do plasmódio (HOPPE et al., 2004).

Na Figura 16 estão representados os principais alcoóis quinolínicos e os principais derivados 4-aminoquinolínicos.



**Figura 16:** Estruturas dos álcoois quinolínicos: Quinina (A) e Mefloquina (C), e das 4-aminoquinolinas: Cloroquina (B), Amodiaquina (D), Hidroxi-cloroquina (E). Fonte: FRANÇA et al., 2008.

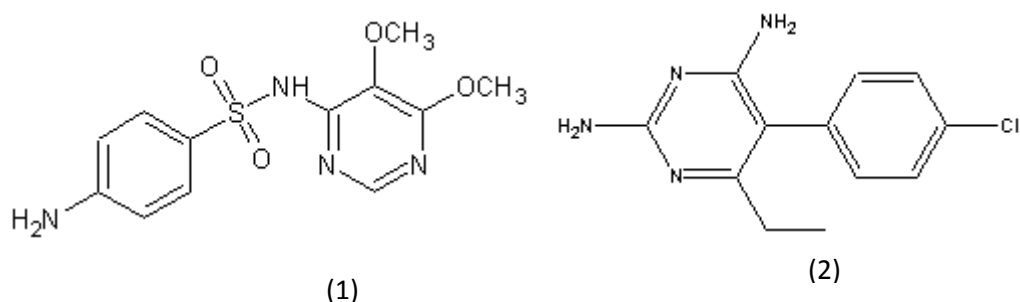
As 8-aminoquinolinas representam os clássicos agentes esquizonticidas teciduais, em contraposição com os esquizonticidas sanguíneos, sendo a primaquina (Figura 17) o membro mais importante da família, por sua potente atividade contra as formas teciduais primárias e secundárias do plasmódio. Modificações moleculares da primaquina conduziram a novas estruturas derivadas das 8-aminoquinolinas que apresentam atividade esquizonticida sanguínea, abrindo novos horizontes para a quimioterapia da malária (VANGAPANDU et. al, 2003).



**Figura 17:** Estrutura química da Primaquina. Fonte: FRANÇA et al., 2008.

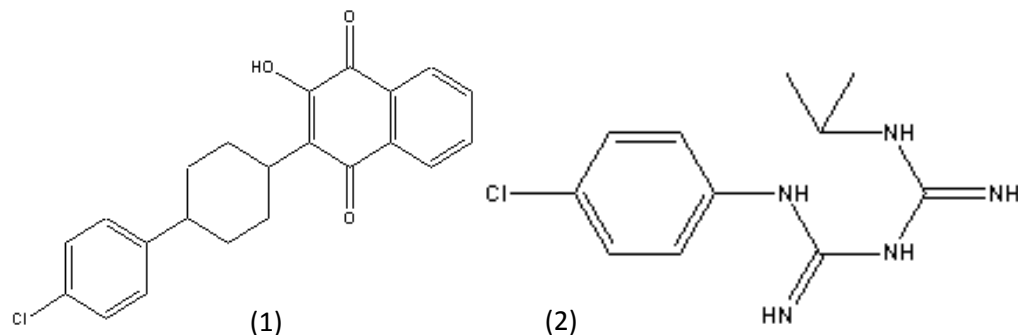
A primaquina é um antimalárico 8-aminoquinolina com um mecanismo de ação desconhecido, mas é o principal medicamento disponível eficaz contra os gametócitos do *P. falciparum*, além disso, elimina os hipnozoítos de *P. vivax* e *P. ovale* (FRANÇA et al., 2008).

Os chamados antifolatos são antibióticos clássicos, como a biguanidas e sulfonamidas, que exercem sua ação antibiótica por inibição da biossíntese do folato, um fator de crescimento essencial para o parasito. A biossíntese do folato pode ser comprometida por inibição das enzimas diidropteroato sintetase (DHPS) e a diidrofolato redutase (DHFR). O metabolismo do folato é crítico para a viabilidade do *Plasmodium*, no entanto, devido à resistência generalizada dos parasitos frente aos antibióticos inibidores desta via, esses derivados são utilizados em terapias combinadas, como a combinação de pirimetamina e sulfadoxina (Figura 18) largamente empregada (RIDLEY, 2002). A inibição da via do folato reduz a síntese de pirimidina com efeitos subsequentes sobre o DNA, serina e produção de metionina. Esses fármacos são bem tolerados, de baixo custo e estão disponíveis apenas por via oral (VO). O longo tempo de meia-vida desses fármacos oferece proteção contra novas infecções durante um período prolongado. A combinação com amodiaquina tem sido utilizada ao invés de amodiaquina-artesunato para evitar novas infecções em Uganda, uma região altamente endêmica (YEKA et al., 2005).



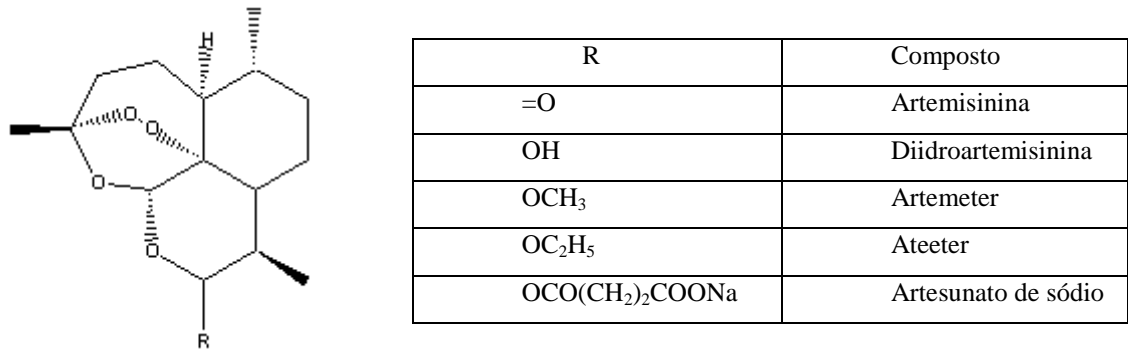
**Figura 18:** Estruturas químicas da Sulfadoxina (1) e Pirimetamina (2).

A atovaquona é um derivado hidroxinaftoquinona cuja atividade antiplasmódica está relacionada com a inibição seletiva da cadeia respiratória mitocondrial do parasito no complexo citocromo bc1 imitando o substrato natural, a ubiquinona, afetando, desta forma, a biossíntese de pirimidina (SRIVASTAVA et al., 1999). Esse fármaco é frequentemente usado em combinação com o proguanil (Figura 19), um derivado biguanídico inibidor da DHFR (VALE, 2005). A combinação atovaquona-proguanil é empregada para o tratamento e prevenção de *P. falciparum* resistente à cloroquina e é disponível somente VO. A biodisponibilidade oral é aumentada quando tomado com alimentos gordurosos. A utilização de monoterapia de atovaquona resultou em uma alta taxa de insucesso devido ao rápido desenvolvimento de resistência (LOOAREESUWAN et al., 1998).



**Figura 19:** Estruturas químicas da Atovaquona (1) e Proguanil (2).

Os derivados da artemisinina são parte do arsenal de terapia combinada por causa da baixa prevalência da resistência e seus efeitos gametocidas (BRASIL, 2010). Artemisinina foi isolado a partir da *Artemisia annua* e é uma lactona sesquiterpênica. Devido a baixa solubilidade em água e em óleo deve ser administrado apenas VO. Os derivados artesunato e artemeter são administrados por injeção IV e IM, repectivamente. Artemisinina e artesunato também estão disponíveis como supositórios, proporcionando uma importante opção terapêutica, sobretudo nas zonas rurais onde as agulhas estéreis para injeção IM / IV não estão facilmente disponíveis. Todos estes fármacos compartilham o mesmo metabólito ativo, diidroartemisina. Os compostos da artemisinina mostram semelhanças estruturais com a tapsigargina, um inibidor do SERCA (FRANÇA, 2008; DAILY, 2006). Na Figura 20 são encontradas as estruturas químicas da artemisinina e seus derivados.



**Figura 20:** Estruturas químicas da artemisinina e seus derivados. Fonte: FRANÇA et al., 2008

A *A. annua* é atualmente cultivada em vários continentes com a finalidade de produção de artemisinina e seus derivados, que representam a primeira linha de escolha no controle da doença e base da terapia combinada para os casos de cepas do *P. falciparum* cloroquina-resistente. (TAUIL, 2006). O mecanismo de ação dos antimaláricos quinolínicos, bem como artemisinina, parece estar relacionado com a interação dos mesmos com o heme.

Assim, a terapia e profilaxia da malária são muitas vezes limitadas por fatores como a resistência dos agentes etiológicos aos medicamentos, baixa eficácia dos fármacos, questões de segurança, da baixa adesão e de alto custo, especialmente nos países mais pobres. Na quimioprofilaxia os mais utilizados são a pirimetamina, o proguanil e a atovaquona. O medicamento de escolha atual para a profilaxia é uma combinação de dose fixa atovaquona-proguanil (Malarone; GlaxoSmithKline), apesar de que é relativamente caro em comparação com outros antimaláricos (KAR & KAR, 2010). O uso dessa opção terapêutica deve ser reservada para situações específicas, na qual o risco de contrair malária grave por *P. falciparum* for maior do que o risco de eventos adversos graves relacionados ao uso das drogas quimioprofiláticas (BRASIL, 2010).

No Brasil, onde a malária tem baixa incidência e há predomínio de infecção por *P. vivax*, observa-se baixa eficácia dos fármacos utilizados para a quimioprofilaxia. Assim, pela ampla distribuição da rede de diagnóstico e tratamento para malária, não se indica a quimioprofilaxia para viajantes em território nacional (BRASIL, 2010).

O uso de medicamentos combinados, de preferência aqueles com diferentes mecanismos de ação, pode reduzir o risco de desenvolvimento de resistência em relação ao conjunto (KAR & KAR, 2010). As combinações devem apresentar vantagens importantes sobre monoterapias. Em primeiro lugar, elas devem proporcionar uma melhor eficácia, ou seja, as combinações adequadamente escolhidas devem ser, pelo menos, aditivo em potência e

resultar em uma atividade sinérgica. Segundo, as combinações de medicamentos aumentam a probabilidade de que, na definição de resistência a drogas, pelo menos um agente irá ser clinicamente ativo. Terceiro, e provavelmente o mais importante, combinações de medicamentos devem reduzir a seleção de resistência às drogas antimaláricas. Assim, uma combinação ideal seria aquela em que incorporaria dois agentes, novos (de modo que os parasitos resistentes a um ou outro agente não esteja já em circulação), proporcionar uma potente eficácia e, de preferência, terem perfis farmacocinéticos semelhantes (para limitar a exposição dos agentes individuais a pressões de resistência). Infelizmente, estes são requisitos desafiadores que não são atendidos por qualquer combinação disponível no momento (FIDOCK et al., 2004).

Dados das últimas três décadas revelam que cerca de 1.700 novos fármacos foram registrados e, entre eles, somente quinze foram destinados às doenças tropicais e, dentre esses, 4 a 5 contra malária. Esse panorama ilustra dramaticamente a inquestionável evidência de que os esforços das companhias farmacêuticas, obviamente, não são proporcionais à mortalidade de certas patologias, mas sim a um mercado mais rentável (FATTORUSSO & TAGLIALATELA-SCAFATI, 2009).

## 2.7. Estresse oxidativo: relação com a malária

A vida aeróbia é fundamentada em reações de oxidação, sendo originados dela inúmeros compostos conhecidos como radicais livres que são produzidos naturalmente ou por disfunções biológicas. Essas espécies químicas caracterizadas por elétrons não emparelhados no átomo de oxigênio são denominadas espécies reativas de oxigênio (ERO), ou espécies reativas de nitrogênio (ERN) no caso do nitrogênio (VISIOLI et al. 2000, FINKEL & HOLBROOK, 2000; PIETTA, 2000). A produção exagerada dessas espécies acarreta danos celulares como peroxidação de lipídeos, reações indesejáveis com proteínas e enzimas, agressões ao DNA, sendo esta combinação de fatores determinantes no aparecimento de diversas patologias como: artrite, câncer, doenças cardiovasculares, catarata, disfunções cognitivas, dentre outras.

As principais **ERO** distribuem-se em dois grupos, os radicalares: hidroxila ( $\text{HO}^\bullet$ ), superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), peroxila ( $\text{ROO}^\bullet$ ) e alcoxila ( $\text{RO}^\bullet$ ); e os não-radicalares: oxigênio singlete, peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso. Dentre as **ERN** incluem-se o óxido nítrico ( $\text{NO}^\bullet$ ), óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ), ácido nitroso ( $\text{HNO}_2$ ), nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ), nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) e peroxinitritos ( $\text{ONOO}^-$ ) (BLOKHINA et al., 2003, BARREIROS et al., 2006). A reação com as

biomoléculas é por abstração de hidrogênio e por adição a insaturações, o que ocasiona danos ao RNA, DNA, proteínas, lipídeos, membranas do núcleo e mitocôndria (BARREIROS et al. 2006).

O radical hidroxila ( $\text{HO}^\bullet$ ) é formado no organismo principalmente por dois mecanismos: reação de  $\text{H}_2\text{O}_2$  com metais de transição e homólise da água por exposição à radiação ionizante e é, dentre os radicais livres, o mais agressivo ao organismo, pois devido a sua meia-vida muito curta, dificilmente pode ser sequestrado *in vivo*. A infecção pelo *Plasmodium* na malária induz a geração de radicais hidroxila no fígado, que provavelmente é a principal causa do estresse oxidativo e apoptose (PERCÁRIO et al., 2012). Além disso, Atamma e colaboradores (1993) observaram que eritrócitos infectados por *P. falciparum* produzem quantidades de  $\text{HO}^\bullet$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$  duas vezes maiores comparados aos eritrócitos normais.

No início da década de 1950, surgiam os primeiros estudos sobre o importante papel de espécies reativas do oxigênio em diversas patologias humanas e a malária é uma delas. Durante a infecção, os monócitos e neutrófilos são maciçamente recrutados e ativados, produzem elevados níveis de ERO, embora outros mecanismos também estejam envolvidos. Mas, por outro lado, o estresse oxidativo representa para o paciente uma forma de combate às formas intraeritrocíticas do parasito. Vários estudos têm sido conduzidos ao longo dos anos, na tentativa de elucidar o efeito de substâncias antimaláricas no estresse oxidativo, uma vez que a indução da elevação no nível de ERO (seja por estímulo à produção dessas substâncias ou efeito sobre o sistema antioxidante do parasito) poderia ser benéfica no ataque ao parasito, por outro lado, essas substâncias têm um papel importante na fisiopatologia da malária. Os sistemas antioxidantes de defesa ficam prejudicados durante a doença. O tratamento com antioxidantes reforçaria esses sistemas de defesa e protegeria o paciente, especialmente durante a fase de risco de vida da doença (POSTMA, 1996).

Estudos de pacientes com malária, especialmente crianças, sugerem que a produção não equilibrada de ERO por monócitos podem exacerbar a infecção. Ainda, alteração do metabolismo redox ao nível da célula hospedeira (especialmente células endoteliais) também pode contribuir para as manifestações da doença e o estresse oxidativo aumentado em eritrócitos pode contribuir para a hemólise e desenvolvimento de anemia (BECKERA et al., 2004). Assim, várias pesquisas tem mostrado que as ERO mediam os danos neurológicos na malária cerebral e o tratamento adjuvante com antioxidantes e antimaláricos (como a cloroquina), nos primeiros sinais da malária cerebral, previne o desenvolvimento de danos cognitivos permanentes (REIS et al., 2010).

O estresse oxidativo é comumente observado a partir de cinco fontes durante fisiopatogenia da doença: 1, devido ao processo inflamatório iniciado no hospedeiro em resposta à infecção; 2, à catálise de metal de transição, uma vez que na alimentação à base de hemoglobina o parasito libera quantidades significativas de ferro livre; 3, à ocorrência de síndrome de isquemia-reperfusão, que resulta dos processos de citoaderência e anemia desencadeadas pela infecção; 4, à produção de espécies reativas diretas do parasito e 5, à ação de drogas antimaláricas (PERCÁRIO et al., 2012).

O estresse oxidativo resulta da proteólise intraeritrocitária da hemoglobina pelo *Plasmodium*. A hemoglobina representa a principal fonte de aminoácidos para o parasito, e durante a sua degradação no vacúolo digestivo ácido, o grupo heme oxidante é separado das cadeias de globina e conseqüentemente, gera uma grande quantidade de ERO e de outros radicais livres (GINSBURG & ATAMMA 1994; RODRIGUES & GAMBOA 2009). As ERO atacam os ácidos graxos poliinsaturados e proteínas dos eritrócitos infectados e não infectados o que conduz à destruição das células, resultando em anemia (DONDORP et al 1999; OMODEO et al., 2003). Além disso, há lesões neurocognitiva e neurodegenerativa (REIS et al. 2010), alterações patológicas do cérebro e do fígado (BECKER et al 2004; GUHA et al., 2006.), bem como insuficiência renal (NANDA et al. 2004).

Sabe-se que grandes quantidades de ERO são produzidas pelas formas eritrocítica e hepática do plasmódio, quer seja induzidas pelo próprio parasito, quer por resposta imune do hospedeiro. O papel do estresse oxidativo na malária ainda é bastante controverso (RAJIC et al., 2010), uma vez que há fortes evidências de que seja um fator patobioquímico e clínico, bem como um alvo terapêutico efetivo na malária. Contudo, estudos demonstram que substâncias que atuam sobre o  $Fe^{2+}$ , impedindo-o de passar a  $Fe^{3+}$ , inibem a polimerização do heme, inibindo o processo de destoxificação pelo parasito. O conseqüente acúmulo de ferri / ferroprotoporfirina IX (FP) resulta em danos às membranas e às enzimas, em função da propriedade tipo detergente da FP, bem como sua participação nas reações redox, culminando na morte do parasito. Vias alternativas de desintoxicação da ferri / ferroprotoporfirina IX (FP), incluem a degradação da FP, a reação com a glutatona e a ligação à proteína de ligação de FP. No entanto, mesmo que apenas uma pequena quantidade (por exemplo, 0,5%) de FP escape aos processos de neutralização, pode causar danos redox às proteínas e às membranas do hospedeiro, inibir enzimas do parasito e lisar os eritrócitos. Além do estresse oxidativo derivado metabolicamente, a produção de ERO pelo sistema imune do hospedeiro contribui para a taxa oxidativa global das células parasitadas. (BECKERA et al., 2004).

Na infecção por malária é evidente a variação de antioxidantes no curso da doença. Um estudo conduzido com 273 crianças de idade entre 1-10 anos com malária causada por *P. falciparum* em Kampala, Uganda, verificou o status antioxidante na patogênese. A análise do plasma revelou que elas continham baixa concentração de antioxidantes. Por outro lado, aquelas com altos níveis de licopeno demonstraram uma alta depuração da parasitemia (METZGER et al. 2001). Nesse mesmo contexto, outras substâncias são conhecidas por agir como adjuvantes na terapia farmacológica, como a riboflavina que é um agente redutor e age no vacúolo alimentar do parasito e na formação de hemozoína. Outro exemplo é a alicina, encontrada nos extratos de alho, que é um inibidor da protease de cisteína, atuando através da inibição do processamento da proteína circunsporozoítio (CSP), essencial para a invasão das células do hospedeiro humano (COPPI et al., 2006).

Apesar da crença comum de que a habilidade para induzir o estresse oxidativo é um típico mecanismo de fármacos antimaláricos, nos últimos anos, vários extratos de plantas e outros produtos naturais foram testados por suas propriedades antioxidantes, assim interferem com os mecanismos da doença modulando a via de sinalização celular, e não por indução direta da morte dos parasitos. Esta abordagem tem mostrado resultados muito promissores, com altas taxas de atividade esquizotóxica e antiparasitária, mas com pequenas alterações no equilíbrio redox do hospedeiro. Algumas das plantas testadas para este fim incluem folhas de *Piper betle* L., *Anogeissus leiocarpus*, sementes de *Nigella sativa* e flavonoides de *Artemisia annua* L. (PERCÁRIO et al., 2012)

Da mesma forma, o cogumelo *Agaricus sylvaticus*, que apresenta alta capacidade antioxidante, tem sido testado em camundongos infectados com *P. berghei*. Ele promove um aumento na capacidade antioxidante total de animais, ocorre diminuição da peroxidação lipídica, do óxido nítrico no pulmão e no cérebro destes animais. Estas alterações bioquímicas foram correlacionadas com uma redução significativa na parasitemia dos animais (SILVA, 2011; GOMES, 2011).

Além disso, o uso de antioxidantes pode reverter ou minimizar os danos oxidativos nos hospedeiros causados pelo uso de drogas antimaláricas. A administração de curcumina, um antioxidante natural obtido a partir de *Curcuma longa*, preveniu a hepatotoxicidade em ratos tratados com cloroquina (DATTANI et al., 2010). Da mesma forma, a administração de glutatona reduziu a parasitemia e promoveu uma maior sobrevivência de camundongos infectados com *P. berghei* (GHASHGAEINIA et al., 2010).



## 2.8. Malária e produtos naturais

As plantas continuam a servir como base para novos medicamentos ainda nos dias atuais. Das últimas drogas introduzidas entre 1981 e 2006 cerca de 62% delas foram produtos naturais, derivados de produtos naturais (usados semissinteticamente) ou continham o grupo farmacofórico de um produto natural. A química combinatória sintética e os estudos por busca de potenciais alvos de drogas havia, em parte, desconectado a histórica ligação entre plantas e medicamentos. Hoje, contudo, a baixa produção e desenvolvimento de antimaláricos pela pesquisa farmacêutica têm estimulado o aumento do interesse no potencial dos produtos naturais para o tratamento da malária (NEWMAN & CRAGG, 2007).

A maioria das substâncias antimaláricas que está agora em uso não foi desenvolvida com base em alvos terapêuticos racionalmente identificados, mas seguindo a identificação da atividade antimalárica de produtos naturais (por exemplo, quinina e artemisinina) ou substâncias quimicamente relacionadas com os produtos naturais (por exemplo, cloroquina e artesunato). Conseqüentemente, numerosos esforços no sentido de identificar atividade antiplasmodial a partir de plantas tradicionalmente usadas para tratar febre e/ou malária têm sido empregados por pesquisadores de todo o mundo (CARVALHO & KRETTLI, 1991; KRETTLI et al., 2001; SAXENA et al., 2003; WILLCOX & BODEKER, 2004; WRIGHT, 2005; BOTSARIS, 2007; MARIATH et al., 2009). As pesquisas de isolamento de substâncias naturais guiadas pela avaliação da atividade antiplasmodial, têm resultado na identificação de diferentes classes de metabólitos secundários ativos como limonoides, cumarinas, alcaloides, flavonoides (incluindo chalconas), quassinoides, terpenos, xantonas, quinonas, entre outros (SAXENA et al., 2003; KAUR et al., 2009).

Em 1999 foi criado o Research Initiative on Traditional Antimalarial Methods (RITAM) para incentivar a busca de novos antimaláricos a partir de bioprodutos, uma iniciativa da Universidade de Oxford, Inglaterra, e da Divisão de Pesquisas em Doenças Tropicais da OMS (WILLCOX & BODEKER, 2000). O redescobrimto das propriedades medicinais das plantas vem se intensificando e os produtos naturais continuam contribuindo para o desenvolvimento de novos medicamentos, principalmente no que diz respeito a doenças negligenciadas (IOSET, 2008).

As plantas são uma fonte inesgotável de possíveis candidatos a fármacos e seu potencial antimalárico tem sido estudado através dos anos por diversos pesquisadores ao redor do mundo. A partir de 204 extratos de plantas do cerrado brasileiro testados no intuito de ser avaliada a atividade antimalárica, 32 (15,7%) mostraram significativa redução do crescimento

do *Plasmodium* a 10,0 µg/ mL. As espécies mais ativas atingiram valores de CE<sub>50</sub> variando de 0,9 µg/mL (Flacourtiaceae e Sapindaceae) a 4,9 µg/mL (Apocynaceae e Annonaceae) (MESQUITA et al., 2007).

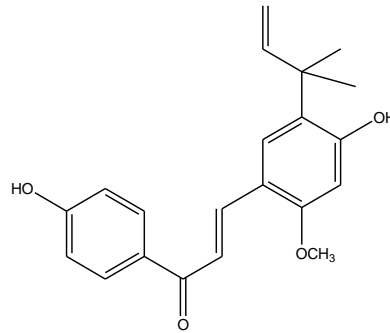
Garavito e colaboradores (2006) relataram que oito extratos de plantas da Colômbia dispunham de boa atividade antimalárica (CE<sub>50</sub> <1–2,1 µg/mL), enquanto no modelo *in vivo* apenas *Abuta grandifolia* (extrato alcaloídico) exibiu atividade ao inibir 66% do crescimento do parasito a 250 mg/kg/dia.

Baelmans e colaboradores (2000) avaliaram 178 extratos de plantas na Bolívia, no intuito de encontrarem novas possibilidades farmacológicas para o tratamento da malária. Destas, apenas cinco (*Aloysia virgata*, *Bixa orellana*, *Caesalpinia pluviosa*, *Mascagnia stannea* e *Trichilia pleenea*) atingiram mais de 70% de inibição da polimerização da hematina (FBIT) a 2,5 mg/mL.

Com a tendência atual da terapia combinada, ou seja, a combinação de substâncias que atuem em diferentes estágios do ciclo de vida do parasito, os produtos naturais apresentam grande diversidade estrutural, sendo muitos deles constituídos por moléculas ativas relativamente pequenas, as quais apresentam múltiplas propriedades farmacológicas e, portanto, são fortes candidatos a novas classes de fármacos antimaláricos (MAYER et al., 2009; FATTORUSSO et al., 2006).

Os flavonoides mostram grande variedade de atividades biológicas e farmacológicas, algumas das quais são atribuídas as suas propriedades de extinção de radicais livres, de complexar metais e de se ligar a proteínas (HAYSTEEN, 2002). Vários derivados flavonoídicos têm sido isolados e caracterizados de muitas plantas medicinais usadas no tratamento de infecções em todo o mundo (YENESEWA et al., 2012).

O reconhecimento da chalcona denominada licochalcona A (Figura 21), como um protótipo para o desenvolvimento de novos fármacos antimaláricos (CE<sub>50</sub> 5,6 ± 0,6 µM), tem despertado o interesse sobre a atividade antimalárica de chalconas e outros flavonoides (ZIEGLER et al., 2004). Recentemente, Ferreira e colaboradores (2010) pontuaram que a artemisinina, em sua forma original, está em mistura com flavonoides, os quais atuam de forma sinérgica com ela. Contudo, esses flavonoides são perdidos no processo de semissíntese dos derivados de artemisinina.



**Figura 21:** Estrutura química da licochalcona A.

A propriedade antioxidante dos derivados flavonoídicos parece ser importante no tratamento da malária, uma vez que o estresse oxidativo normalmente acompanha essa infecção (GRIFFITHS et al.; 2001). Isto se deve a elevada produção de ERO e, portanto, os flavonoides protegeriam as células dos efeitos deletérios do estresse oxidativo em pacientes com malária. Porém, mais estudos são necessários para determinar o verdadeiro valor clínico dessa classe de produtos naturais no tratamento da malária (MULLER, 2004).

Projetos de busca de bioprodutos com potencial na terapêutica de doenças negligenciadas são especialmente relevantes no Brasil, uma vez que é onde se encontra uma das mais ricas floras do mundo, com pelo menos 50.000 espécies, ou seja, um sexto de todas as plantas do planeta. Assim, observa-se no Brasil um interesse crescente do setor produtivo pelas plantas medicinais e fitoterápicos, incluindo indústrias transnacionais. Esse interesse está relacionado ao menor volume de recursos necessários para o desenvolvimento de fitoterápicos, em comparação com os diversos milhões de dólares despendidos para lançar um novo medicamento sintético. Dessa forma, o menor custo durante a pesquisa e o desenvolvimento torna os fitoterápicos mais adequados à realidade das indústrias de países em desenvolvimento, podendo estes constituir o ponto de partida para o estabelecimento e crescimento de indústrias farmacêuticas nacionais (CALIXTO, 2000; CALIXTO, 2005). Idealmente devem ser definidos marcadores relacionados com a atividade farmacológica; no entanto, faltam pesquisas sobre tal relação (CALIXTO 2000). Este controle da concentração de marcadores químicos é fundamental devido à variabilidade química da droga vegetal e possibilidade da ocorrência de degradação durante os processos de pós-coleta, ou pós-colheita, durante o armazenamento e transformação.

## 2.9. Métodos de avaliação da atividade antimalárica

### 2.9.1. Métodos *in vitro*

Os testes de sensibilidade a drogas têm por objetivo avaliar a sensibilidade do *P. falciparum in vitro*, frente a doses crescentes de determinada amostra. Os resultados da análise dos ensaios são apresentados como porcentagem do crescimento parasitário comparado com culturas não tratadas. O uso desses métodos permite um descarte quase total de fatores interferentes relacionados ao hospedeiro, tais como sua imunidade e seu metabolismo em relação à amostra teste, dessa forma oferecem uma avaliação direta do impacto do fármaco. Os testes *in vitro* para a verificação da atividade antiplasmodial geralmente utilizam o método de cultura contínua desenvolvido por Trager e Jensen (TRAGER & JENSEN, 1976) e a técnica de microcultura desenvolvida por Rieckmann (RIECKMANN et al., 1978).

Para a avaliação do potencial antiplasmodial das amostras, vários métodos *in vitro* são comumente utilizados para verificar a inibição do crescimento do *P. falciparum* como o ensaio isotópico, no qual ocorre incorporação de um precursor de ácido nucleico radiomarcado (por exemplo, hipoxantina radiomarcada); e a quantificação de proteínas como a lactato desidrogenase (LDH) do parasito pelo ensaio imunoenzimático ELISA (NOGUEIRA & ROSÁRIO, 2010).

O ensaio com incorporação de hipoxantina radiomarcada vem sendo utilizado como padrão ouro para os testes de susceptibilidade a possíveis novos agentes terapêuticos. A hipoxantina é a base utilizada principalmente pelo parasito para síntese de adenosina e guanina (DESJARDINS et al., 1979). Então, é introduzida hipoxantina marcada no meio de cultura e os parasitos a incorporam em seus ácidos nucleicos. Com auxílio de um contador beta pode-se detectar o nível de radioatividade, que é proporcional à parasitemia. As normas referentes ao manuseio de materiais radioativos se tornaram bem mais restritivas, objetivando limitar a sua utilização a campos em que não há qualquer metodologia alternativa disponível. Outra limitação é o alto custo do equipamento necessário, como contadores de cintilação líquida e equipamentos de colheita. Por exigir densidades parasitárias relativamente altas (de aproximadamente 0,5%), este método tem aplicabilidade limitada ao uso de cepas de parasitos adaptadas a culturas ou a amostras de campo com parasitemia alta. Estas barreiras tornam o seu uso rotineiro mais caro e difícil em contextos de pesquisa e de atendimento clínico, particularmente em ambientes com recursos limitados (NOEDL et al., 2003)

O ensaio *Double-site Enzyme-linked LDH Immunodetection* (DELI) é bastante sensível e tem por finalidade mensurar a sensibilidade à droga *in vitro* do *P. falciparum* de forma mais fácil, rápida e com equipamentos mais simples que os exigidos para realizar os testes isotópicos. Em comparação com este último, densidades mais baixas do parasito podem ser testadas pelo DELI (até 0,005%), aumentando assim o número de amostras que podem ser avaliados (BROCKMAN et al., 2004; BARENDS et al., 2007)

O teste de atividade enzimática do pLDH é baseado na observação de que a enzima LDH do *P. falciparum* possui a capacidade de usar rapidamente o 3-acetilpiridina adenina dinucleotídeo (APAD) como uma coenzima na reação, que leva à formação de piruvato a partir do lactato. Já a LDH da hemácia humana executa esta reação de forma mais lenta na presença de APAD. O desenvolvimento da APADH é então quantificado e faz-se uma correlação entre os níveis de parasitemia e a atividade do LDH do parasita. A reação leva a formação de APAD reduzida, a qual reduz o NBT (Nitro Blue Tetrazolium) formando um derivado formazan azul, detectável a  $\lambda$  650 nm (DEHARO et al., 2000; NKHOMA et al., 2007).

Um teste que tem sido bastante utilizado, ultimamente, para a avaliação do mecanismo da atividade antiplasmodial é o teste de inibição da polimerização do heme. O *P. falciparum* em sua fase eritrocitária utiliza a hemoglobina como fonte de aminoácidos deixando livres os grupos hemínicos, que são tóxicos ao parasito. A forma encontrada para se proteger da ação oxidante dos grupos porfirínicos foi polimerizar os grupos heme formando hemozoína (DEHARO et al., 2000, EGAN et al., 2008).

O grupo heme apresenta-se química e estruturalmente semelhante à hemina que é utilizada como base no ensaio para avaliação da polimerização. Drogas inibitórias dessa reação são consideradas potencialmente antimaláricas. Pesquisas têm mostrado que antimaláricos com estruturas de endoperóxidos e quinolínicos (como a quinidina, halofrantina, destutilhalofrantina, mefloquina, quinacrina, amodiaquina pironaridina, quinina, primaquina, cloroquina) inibem o processo de cristalização, originando quantidades de hematina livre que são tóxicas ao parasito (EGAN et al., 1999, 2001; DORN et al., 1998)

É um ensaio espectrofotométrico baseado na incubação da hemina com as amostras avaliadas, sendo a diferença de solubilidade da hemina e da  $\beta$ -hematina em diferentes veículos (DMSO e NaOH) o fator preponderante na avaliação da resposta farmacológica (GARAVITO et al., 2002; 2006).

O princípio básico deste ensaio consiste em gerar um ambiente similar ao do vacúolo digestivo do parasito em placa de 96 poços, condições essas em que a hemina (ou hematina)

comercial, dão origem a cristais. O objetivo final deste teste é encontrar substâncias que possam efetivamente acumular-se nos vacúolos digestivos do parasito e gerar mudanças no ambiente físico-químico necessário para a biocristalização ou interagir com o heme para impedir sua biocristalização, as quais representariam grande potencial antimalárico, uma vez que se trata de um processo crítico para o desenvolvimento do parasito. Porém, este ensaio trata-se de um processo *in vitro* que simula as condições de biocristalização a um nível de interação entre os componentes já em mistura, sem levar em consideração que uma substância que eventualmente apresente atividade, deverá atravessar pelo menos três tipos de membranas antes de chegar ao seu sítio ativo de ação: membrana do eritrócito, membrana do parasito e membrana do vacúolo digestivo (PARAPINI et al., 2000; EGAN et al., 2001; GARAVITO et al., 2006).

### 2.9.2. Método *in vivo*

Quatro espécies de parasitos causadores de malária extraídos de roedores africanos foram adaptadas para o crescimento em camundongos, sendo eles: *P. berghei*, 1948; *P. chabaudi*, 1965; *P. vinckei*, 1952; e *P. yoelii*, 1965. Estes modelos de parasitos tornaram-se amplamente utilizados especialmente devido à facilidade de manuseio e de criação de ratos e camundongos em laboratório. Além disso, o modelo de malária animal permite compreender a biologia e patologia da malária e, ainda, é uma ferramenta potente na avaliação farmacológica de novas alternativas terapêuticas para o tratamento desta doença. Mesmo que o sistema imune dos roedores e a farmacocinética dos fármacos neles se diferenciem dos humanos, tem-se observado a mesma sensibilidade aos fármacos por parte dos *Plasmodium* de roedores e de humanos e todas as espécies de *Plasmodium* têm ciclos biológicos comparáveis (NOGUEIRA & ROSÁRIO 2010).

Cada uma das quatro espécies de malária de roedores tem características similares a quatro espécies de malária humana, o que as torna adequadas para o estudo paralelo. São usados como modelo, por exemplo, a variação antigênica de *P. chabaudi* (PHILLIPS, 1997), os testes *in vivo* com drogas e *P. berghei* (VAN VIANEN, 1993) ou *P. chabaudi* (ANCELIN et al., 2003), malária cerebral com *P. berghei* ANKA (BAGOT et al., 2004), vacinas em estágio pré-eritrocítico com *P. yoelii* (BECKER et al., 1998) e cronobiologia com *P. vinckei* (GAUTRET et al., 1995).

Um dos testes *in vivo* mais utilizados na avaliação da atividade antimalárica é o teste de Peters (PETERS, 1975). Em síntese, fêmeas de camundongos são infectadas por parasitos de roedores e as doses diferentes de tratamento são ministradas logo após a infecção, no dia 0,

e são repetidas uma vez a cada um dos 3 dias subsequentes. No 5º dia pós-infecção, a parasitemia é avaliada e a inibição ou não causada pelas amostras é calculada a partir da comparação do grupo tratado com o grupo controle negativo. Além disso, acompanham-se os sintomas apresentados por cada animal de cada grupo e a sobrevivência dos mesmos, podendo assim, ter uma ideia da possível toxicidade da amostra testada (CORRALES et al., 2011)

### 3. OBJETIVOS

#### OBJETIVO GERAL

Caracterização fitoquímica e verificação da atividade biológica *in vitro* e *in vivo*, antiplasmodial / antimalárica e antioxidante, dos extratos e frações semipurificadas dos galhos de *Andira nitida* (Fabaceae).

#### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter os extratos e as frações enriquecidas a partir dos galhos de *Andira nitida*.
- Registrar o perfil químico de extratos e frações dos galhos de *A. nitida*, através de técnicas cromatográficas (CCD e CLAE).
- Quantificar os teores totais das principais classes de metabólitos secundários presentes na espécie.
- Estabelecer o potencial antioxidante do extrato hidroalcoólico e frações por meio dos ensaios espectrofotométricos de redução do radical 1,1-difenil-2-picrilidrazila (DPPH), determinação da capacidade antioxidante equivalente ao trolox (TEAC) e quantificação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico formadas na peroxidação de lipossomos.
- Verificar o potencial antiplasmodial / antimalárico dos diferentes extratos e frações semipurificadas através dos testes de inibição do crescimento do *P. falciparum* em culturas *in vitro* e de atividade inibitória sobre a polimerização do heme (FBIT).
- Avaliar a atividade antimalárica *in vivo* das amostras consideradas mais promissoras através do teste supressivo de quatro dias (Teste de Peters).



- Correlacionar os teores de metabólitos secundários determinados das amostras com o potencial para as atividades antioxidante e antimalárica.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Caracterização Química da espécie vegetal *Andira nitida***

#### **4.1.1. Material vegetal**

O material botânico de *Andira nitida* Mart. ex Benth foi coletado em ambiente de restinga no Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, no município de Quissamã, norte do estado do Rio de Janeiro. A planta foi identificada pela Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Tatiana Ungaretti Paleo Konno e uma amostra-testemunho foi depositada na Coleção Botânica do Núcleo em Ecologia e Desenvolvimento Socioambiental (NUPEM/UFRJ), vinculada ao Herbário do Instituto de Biologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (RFA) sob o número RFA 38754. Para a realização do presente trabalho, dispomos de autorização para atividades com finalidade científica, contemplando acesso ao patrimônio genético SISBIO n° 33799-1 e 010212/2012-4, respectivamente.

#### **4.1.2. Equipamentos e reagentes**

- ABTS (2,2-azino-bis-3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico) sal diamônio Sigma Aldrich
- Acetato de etila P.A / ACS. Vetec / TEDIA
- Acetonitrila Grau HPLC Tedia
- Ácido acético glacial All Chemistry do Brasil
- Ácido ascórbico Sigma Aldrich
- Ácido clorídrico 37% Isofar
- Ácido gálico Vetec
- Ácido *p*-cumárico
- Ácido sulfúrico P.A. / ACS 97% Vetec
- Ácido tânico Synth
- Ácido tiobarbitúrico Isofar

- Água ultrapura
- Álcool etílico P.A./ ACS Vetec, Isofar, Tedia
- Álcool metílico P.A. / ACC Vetec, Isofar, CRQ, Tedia
- Anisaldeído Fluka
- Apigenina Fluka
- Balança Analítica Mettler Toledo
- Biochanina A Sigma Aldrich
- BHT Sigma Aldrich
- Catequina Sigma Aldrich
- Carbonato de sódio anidro Vetec
- Centrífuga Fanem 206
- Cloreto de alumínio anidro Carlo Erba Reagenti
- Cloreto de férrico hexaidratado (III) Vetec
- Clorofórmio P.A. / ACS Vetec, CRQ, Tedia
- Cloroquina sal difosfato Sigma Aldrich
- Cumarina Fluka
- Diclorometano P.A./ ACS Impex, Tedia
- DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) Sigma Aldrich
- DMSO (dimetilssulfóxido) Tedia / Synth
- Espectrofotômetro Shimadzu UV 1800
- Eugenol Vetec
- Extrato de Cérebro Bovino Sigma Aldrich

- Extrato seco padronizado de *Gingko biloba* Deg
- Hemina Sigma Aldrich (80%)
- Hexano ACS / P.A. Tedia / Vetec
- Hidróxido de potássio Vetec
- n-Butanol P.A. Carlo Erba
- Persulfato de sódio Sigma Aldrich
- Piridina P.A. Merck
- Placa aquecedora Micro Química MQAMA 301
- Propilgalato Sigma Aldrich
- Quercetina diidratada Fluka
- Reagente Folin Ciocalteu Haloquímica
- Rotavapor Büchi R-114
- Rutina Fluka
- Tampão Fosfato Sigma Aldrich
- Trolox (6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido carboxílico) Sigma Aldrich
- Ultrassom Unique USC 700
- Vanilina Fluka
- Vórtex Phoenix Lufesco AP56

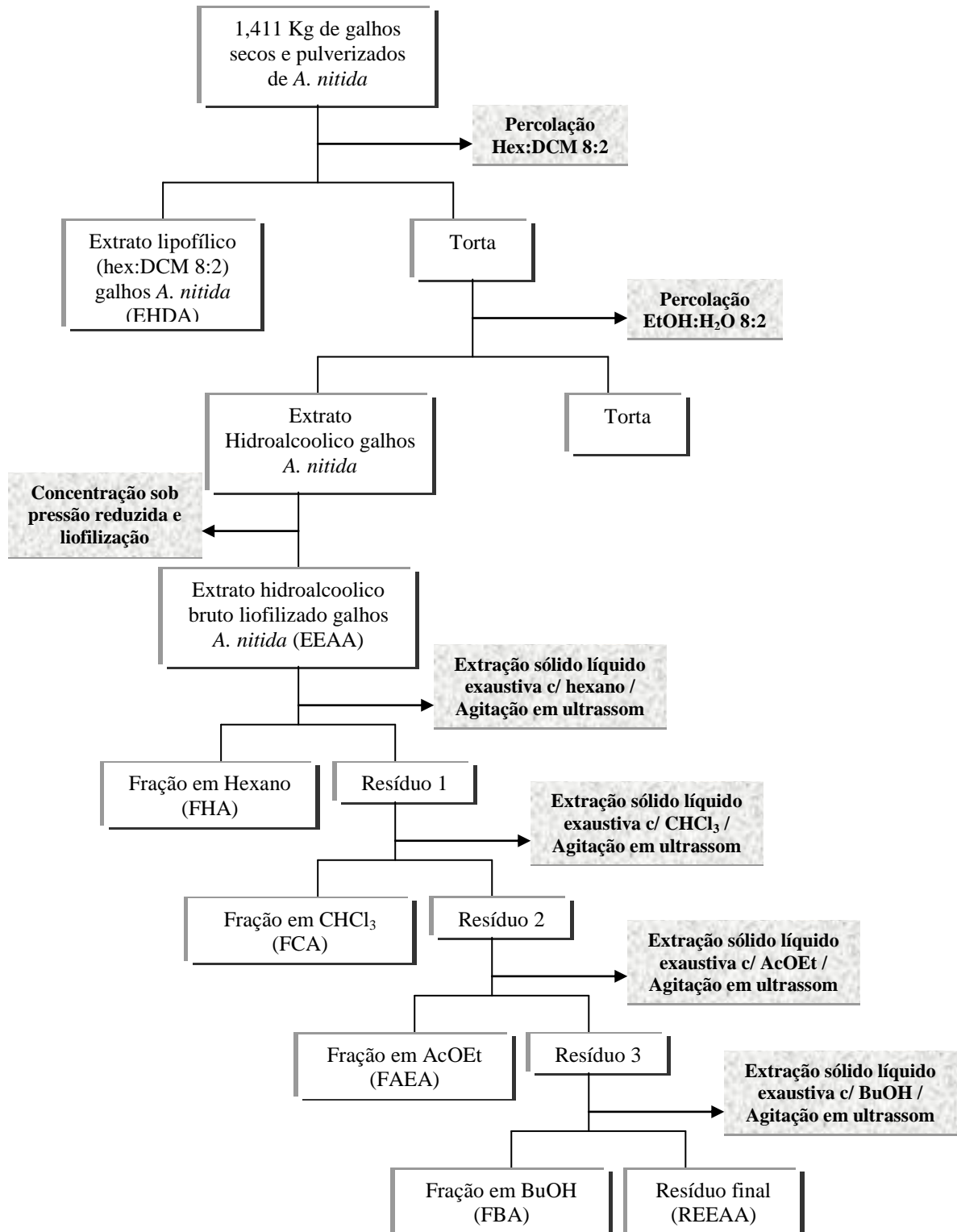
### 4.1.3. Obtenção dos extratos e frações semipurificadas

Após a coleta, o material vegetal sofreu uma triagem para retirar sujidades, sendo as folhas separadas dos galhos.

Para o desenvolvimento desta proposta escolheram-se os galhos como material de partida. Para tanto, os galhos foram secos em estufa com circulação de ar a temperatura de 40°C por tempo necessário até que ficassem desidratados. Em seguida, os galhos secos foram triturados em moinho de facas, resultando em um total de 1,411 Kg de material seco e triturado.

O material vegetal seco e triturado foi submetido ao processo de extração em percolador com hexano:diclorometano (Hex:DCM) 8:2. Após esta etapa, prosseguiu à extração exaustiva com etanol:água (EtOH:H<sub>2</sub>O) 8:2. Os filtrados destas extrações foram recolhidos e o solvente orgânico evaporado sob vácuo, a uma temperatura entre 30 a 40°C, fornecendo os extratos brutos Hex:DCM (extrato lipofílico) e um concentrado aquoso do extrato EtOH:H<sub>2</sub>O (extrato hidroalcoólico).

Após a obtenção do extrato lipofílico dos galhos, o concentrado aquoso obtido do extrato bruto hidroalcoólico dos galhos foi liofilizado, resultando em um total de 80g final, o qual foi posteriormente fracionado em 3 etapas (sendo uma partida de 10g, outra de 50g e outra de 17g de amostra), por extração sólido-líquido, em ultrassom por 20 min, com solventes em ordem crescente de polaridade: hexano, clorofórmio, acetato de etila e butanol. Esse processo, após evaporação dos solventes sob pressão reduzida, rendeu as frações em hexano (FHA), em clorofórmio (FCA), em acetato de etila (FAEA) e em butanol (FBA) (Figura 22). O resíduo após as partições do liofilizado (REEAA) foi mantido para os testes químicos biológicos.



**Figura 22:** Obtenção das frações a partir dos galhos de *Andira nitida*.

#### **4.1.4. Determinação do perfil químico dos extratos e frações semipurificadas por Cromatografia em Camada Delgada**

Para a verificação dos perfis em cromatografia em camada delgada (CCD), os extratos brutos secos e as frações foram ressuspensos em diclorometano e/ou metanol, resultando em soluções a 10mg/mL, sendo aplicados 5µL de cada uma das soluções dos extratos nas cromatoplasmas de sílica gel 60 F<sub>254</sub> Merck®. Foram usados como referências de comparação, soluções a 5mg/mL de eugenol, cumarina, apigenina, referência de esteróide, quercetina, esparteína, catequina, ácido cumárico, ácido tânico e referência de terpenos.

Após a aplicação das amostras e padrões, as cromatoplasmas foram eluídas em diferentes sistemas eluentes, a saber: Hex:CHCl<sub>3</sub> 7:3, Hex:AcOEt 8:2, Hex:AcOEt 1:1, CHCl<sub>3</sub>:MeOH 9:1, CHCl<sub>3</sub>:MeOH 6:4, BuOH:CH<sub>3</sub>COOH:H<sub>2</sub>O 4:1:1 e AcOEt:HCOOH:CH<sub>3</sub>COOH:H<sub>2</sub>O 100:11:11:27.

Após o desenvolvimento, as cromatoplasmas secas foram visualizadas sob luz UV Camag® (254 e 366nm) e em seguida foram reveladas com diversos reveladores de variada seletividade como sulfato cérico (revelador geral), anisaldeído sulfúrico (maior sensibilidade para terpenos), vanilina sulfúrica (terpenos, fenóis), FeCl<sub>3</sub> 10% (derivados fenólicos), Dragendorff (alcaloides), NP-PEG (flavonoides) e KOH 1N (cumarinas).

#### **Reagentes químicos de detecção:**

##### **Anisaldeído sulfúrico**

0,5 g de anisaldeído foram dissolvidos em 10 mL de ácido acético glacial. Adicionaram-se 85 mL de metanol, em seguida 5 mL de ácido sulfúrico concentrado.

##### **Cloreto Férrico 10% (FeCl<sub>3</sub> 10%)**

10 g foram dissolvidos em 100 mL de etanol.

##### **Dragendorff**

Solução A: 0,85 g de nitrato básico de bismuto foram dissolvidos em 10 mL de ácido acético glacial juntamente com 40 mL de água destilada.

Solução B: 8 g de iodeto de potássio foram dissolvidos em 30 mL de água destilada.

Solução-estoque: Misturou-se 1:1 da solução A com B.

Solução de vaporização: 1 mL da solução estoque com 2 mL de ácido acético glacial, em seguida 10 mL de água destilada foram acrescentados.

### **Hidróxido de Potássio 1N**

0,56 g de Hidróxido de potássio foram dissolvidos em 100 mL de água destilada.

### **Reagente Produto natural - difenilborato de aminoetanol - (NP/PEG)**

Solução I: Dissolveu-se 1g de ácido difenilbórico em 100 mL de metanol.

Solução II: 5 g de Polietilenoglicol 4000 foram dissolvidos em 100 mL de etanol.

Solução de vaporização: Aplicou-se primeiramente a solução de ácido difenilbórico na cromatoplaça, em seguida a solução de PEG 4000.

### **Sulfato Cérico**

Foram dissolvidos 2 g de sulfato cérico em 55 mL de ácido sulfúrico concentrado, completando o volume para 1000 mL com água destilada. O procedimento foi efetuado em capela com auxílio de banho de gelo.

### **Vanilina sulfúrica**

Solução I: 5 mL de ácido sulfúrico em 95 mL de etanol.

Solução II: 1 g de vanilina foi dissolvido em 100 mL de etanol.

Solução vaporização: Misturou-se 1:1 as soluções I e II na hora do uso.

## **4.1.5. Verificação do perfil cromatográfico das amostras por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência**

As análises foram realizadas no laboratório de Fitoquímica da Faculdade de Farmácia da UFMG, Belo Horizonte, em um sistema de cromatografia de alta eficiência (LC-DAD) Waters modelo 2695 com detetor de arranjos diodos modelo 2996, equipado com



degaseificador a vácuo, bomba quaternária, injetor de amostra automático e forno para coluna. Foi usada coluna de fase inversa de sílica RP-18 Lichrospher® 100 (125 mm x 4 mm, 5 µm, Merck) em combinação com pré-coluna LiChrospher® 100 Rp-18 (4 x 4 mm d.i., 5µm; Merck). Volume de injeção de 10 µL e fluxo de 1 mL/min. A detecção foi realizada através de arranjo de fotodiodos (PDA) na faixa de  $\lambda$  210-600 nm

Diversos sistemas eluentes e condições cromatográficas de análise foram testados, a fim de ser obtido o melhor perfil de separação das substâncias presentes nas amostras:

- A eluição no modo gradiente no Perfil 1 empregou H<sub>2</sub>O (A) e Metanol (B), utilizando as seguintes condições: 15% (B) em 5 min, 15 a 95% (B) em 50 min, 95% (B) em 5 min, 95% a 5% (B) em 5 min e 15% (B) em 5 min. Temperatura da coluna: 40°C.
- A eluição no modo gradiente no Perfil 2 empregou H<sub>2</sub>O (A) e Metanol (B), utilizando as seguintes condições: 90 A 10% (B) em 40 min, 95% (B) em 5 min, 95 a 10% (B) em 5 min, 10% (B) em 5 min. Temperatura da coluna: 30°C.
- A eluição no modo gradiente no Perfil 3 empregou H<sub>2</sub>O + 1% de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,1N (A) (pH=3,6) e ACN + 1% de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,1N (B), utilizando as seguintes condições: 20% (B) em 5 min, 20 a 30% (B) em 25 min, 30 a 55% (B) em 25 min, 55% (B) em 10 min e 55 a 20% (B) em 5 min. Temperatura da coluna: 40°C.
- A eluição no modo gradiente no Perfil 4 empregou H<sub>2</sub>O + 0,06 % de CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH (A) e ACN (B) (Liu et al., 2009), utilizando as seguintes condições: 10% (B) em 55 min, 10 a 90% (B) em 10 min. Temperatura da coluna: 25°C.

As amostras foram preparadas a 10,0 mg/mL (extratos e frações semipurificadas) solubilizadas em metanol com auxílio de banho ultrassom e centrifugadas a 10.000 rpm, sendo usado o sobrenadante para as análises. As amostras de referência para comparação foram preparados também em metanol em concentrações de 0,5 a 1 mg/mL, sendo estes: orientina, isoorientina, apigenina, canferol, vitexina, delphinidina, (-) epigallocatequina, (-) galocatequina, ácido gálico, luteolina, 7,3'-diidroxí-4'-metoxiisoflavona, formononetina, quercetina 3β-glicosilada e paulownina.

#### 4.1.6. Determinação de conteúdo de derivados fenólicos totais

Os extratos e frações foram pesados em triplicata (10mg) e solubilizados em MeOH para resultar soluções a 10mg/mL. Como o volume de reação final é de 5mL e são usados 0,25 mL de amostra, a amostra é diluída 20 vezes; logo, as soluções de amostra foram preparadas em concentrações 20 vezes maior (0,4mg/mL, 0,3 mg/mL, 0,2 mg/mL, 0,1mg/mL e 0,05mg/mL), diluídas em metanol. Desta forma, as soluções da amostra em MeOH foram testadas em concentrações finais de 20 - 2,5  $\mu$ g/mL.

O ensaio foi realizado conforme o descrito por Wettasinghe e Shahidi (1999), também Zielinski e Kozłowska (2000), com pequenas modificações. Misturou-se 0,25 mL (250  $\mu$ l) de amostra com 0,25 mL (250  $\mu$ L) de reagente de Folin-Ciocalteu, seguido de agitação leve; em seguida acrescentou-se 0,5 ml (500  $\mu$ l) de solução Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 10% e 4 ml de H<sub>2</sub>O deionizada. Após homogenização, os tubos foram agitados vigorosamente em vórtex por 30'. Após 25 min de repouso à temperatura ambiente, os tubos foram centrifugados a ~3500 rpm por 5 a 10 min, sendo o sobrenadante utilizado para fazer a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 760 nm.

Como controles foram efetuados a avaliação dos reagentes (Abs CR), onde 0,25 mL (250  $\mu$ L) de reagente de Folin-Ciocalteu, 0,5 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e 4,25 mL de H<sub>2</sub>O deionizada foram avaliados quanto sua absorvância. E o branco das amostras (Abs B), o qual consistiu de 0,25 mL (250  $\mu$ L) de amostra, 4,75 mL de H<sub>2</sub>O deionizada.

Para expressar os resultados foram construídas curvas analíticas de ácido gálico e catequina. Três curvas analíticas em dias diferentes foram submetidas à análise de covariância, e, comprovando-se a ausência de diferença estatística entre as curvas analíticas obtidas. Os dados foram reunidos, obtendo-se dessa forma uma única curva analítica, cuja equação da regressão do melhor ajuste foi calculada, bem como o valor de correlação ( $R^2$ ). Para esta análise estatística utilizou-se o programa GraphPad Prism, versão 5 (2007) da GraphPad Software.

Para a curva analítica de ácido gálico, 10mg foram pesados em triplicata, os quais foram diluídos em água (soluções-mãe a 10 mg/mL), a fim de que se atingisse as concentrações-teste 10, 25, 50, 75, 100 e 125  $\mu$ g/mL. A curva analítica de catequina foi

elaborada tal qual a de ácido gálico, diferindo apenas nas concentrações-teste, as quais foram 10, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 µg/mL.

#### Análise estatística:

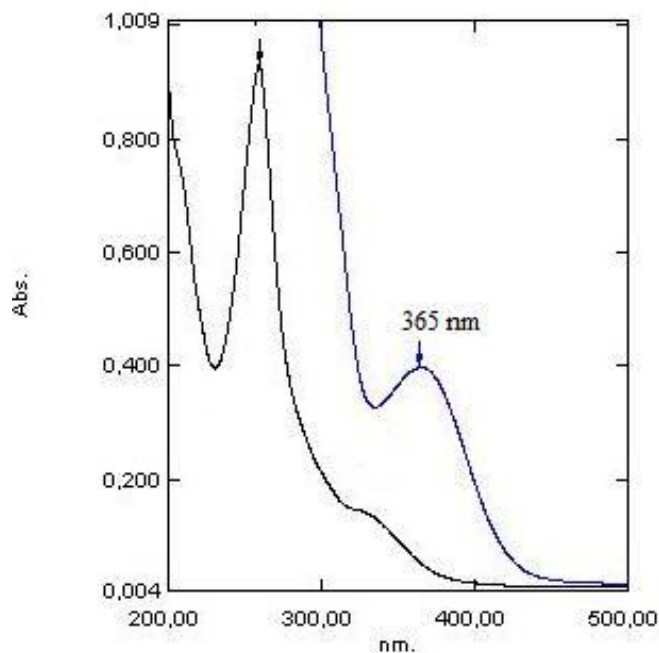
Os teores de derivados fenólicos totais obtidos foram inicialmente submetidos a análise de variância (ANOVA) e posteriormente ao teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) para comparação dos teores médios. As análises estatísticas foram realizadas pelo programa GraphPad Prism, versão 5 (2007) da GraphPad Software.

#### **4.1.7. Quantificação de derivados flavonoídicos**

O teor de flavonoides totais foi determinado utilizando-se o método espectrofotométrico, após reação com cloreto de alumínio 8% (RUSAK et al., 1993; LEITE, 2002; LUENGAS-CAICEDO, 2005) com pequenas modificações.

Para determinar o comprimento de onda ideal, uma solução de biochanina A a 30µg/mL foi utilizada para varredura em comprimento de onda de 500-200 nm no UV-Vis (Figura 23), no qual se observou o máximo de absorção em  $\lambda$  de 365 nm. Também foi avaliado o tempo da reação de complexação ideal para a quantificação dos derivados flavonoídicos, que consistiu na análise da cinética de reação com leituras em espectrofotômetro em  $\lambda$  de 365 nm, a cada 10 min por 240 min. Após análise estatística (ANOVA) das médias das absorvâncias em cada leitura, verificou-se que não houve diferenças significativas nos tempos de leitura, optando-se, assim, por 40 min como o tempo ideal de leitura.

A quercetina foi utilizada como segundo padrão para expressão dos resultados da quantificação de derivados flavonoídicos. Neste caso, apesar da absorvância máxima ter sido 437 nm na varredura (500-200 nm UV-Vis), o comprimento de onda utilizado (415 nm) foi embasado no estudo de Chang e colaboradores (2002).



**Figura 23:** Varredura 500-200 nm da solução de biochanina 30 µg/mL (linha preta) e solução complexada com AlCl<sub>3</sub> (curva azul), demonstrando a absorção a 365 nm (UV<sub>Max</sub>).

O ensaio foi realizado com 3 repetições a partir 50 mg do extrato e das frações. Para cada réplica, a massa pesada da amostra foi transferida quantitativamente para um balão de fundo redondo de 125 mL, em seguida 12 mL de metanol foram adicionados. A mistura foi aquecida, sob refluxo, durante 30 minutos.

Resfriou-se o extrato, sendo este filtrado através de algodão hidrófobo, recolhendo-se o filtrado, quantitativamente, em um balão volumétrico de 25 mL. Ao resíduo do material foi adicionado 10 mL de metanol por mais 30 min de refluxo. Em seguida a mistura foi filtrada, sendo reunido ao volume obtido anteriormente, completou-se o volume do balão com metanol.

Para eliminação de carotenoides e clorofilas, as amostras foram submetidas ao processo de clarificação, no qual 15 mL do extrato foram tratados com 10 mL de diclorometano e 9 mL de água. A mistura foi homogeneizada e centrifugada a 3500 rpm por 10 min, resultando em duas fases a superior (hidrometanólica) e a inferior (fase orgânica – diclorometano). Retirou-se a camada hidrometanólica (superior) com ajuda de uma pipeta e esta foi transferida para um tubo Falcon.

A reação de coloração foi obtida em balão volumétrico de 10 mL, no qual foram adicionados 4,0 mL da solução hidrometanólica, 0,24 mL de ácido acético glacial, 4 mL de solução de piridina–metanol (20:80) e 1,0 mL de solução metanólica de cloreto de alumínio

anidro a 8%. O volume foi completado com metanol, resultando em solução final equivalente a 500 µg/mL.

Agitou-se a mistura e após 30 minutos repouso, centrifugou-se a 5000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um tubo limpo e realizou-se a leitura da absorvância da amostra no comprimento de onda de 365 nm, frente à solução de compensação.

A solução de compensação foi preparada para anular a interferência da coloração natural do extrato ou fração. Para cada amostra preparo-se uma solução de compensação misturando-se 4,0 mL da solução hidrometanólica, 0,24 mL de ácido acético glacial, 4 mL de solução de piridina–metanol (20:80), diluindo para 10,0 mL com metanol. Agitou-se a solução e após 30 minutos repouso foi centrifugada a 3500 rpm por 10 minutos, sendo em seguida, o sobrenadante utilizado para a leitura em espectrofotômetro.

A curva analítica para flavonoides foi obtida a partir de uma solução estoque 500 µg/mL de biochanina A (isoflavona) em metanol, em um balão volumétrico de 10 mL. Alíquotas da solução-mãe foram pipetadas a fim de que se obtivessem as seguidas concentrações finais: 1,5, 6, 18, 30, 42 e 54 µg/mL. Cada um destes volumes foi completado para 2,0 mL pela adição de metanol. Em seguida, foram adicionados: 0,24 mL de ácido acético glacial, 4,0 mL de solução de piridina–água (20:80) e 1,0 mL de solução metanólica de cloreto de alumínio anidro 8% e o volume foi completado para 10,0 mL com água deionizada. De mesma foi preparada a curva de calibração de quercetina com concentrações finais de 1, 2, 4, 6, 8 e 10 µg/mL, sendo a leitura efetuada em  $\lambda$  415 nm.

As soluções foram agitadas, sendo colocadas em repouso por 40 minutos. Depois deste período de tempo, mediu-se a absorvância de cada solução a 365 nm e 415 nm frente ao branco que constou de 0,24 mL de ácido acético glacial, 4,0 mL de solução de piridina–água (20:80) completando-se o volume água.

#### Análises estatísticas

Tanto para Biochanina A, como para Quercetina, três curvas analíticas foram construídas em dias diferentes. Mediante análise de covariância foi comprovada a ausência de diferença estatística entre as curvas analíticas obtidas e, assim, elas foram reunidas em uma única curva, cuja equação da reta de melhor ajuste foi calculada pelo método dos mínimos quadrados.

Os resultados do doseamento foram submetidos à análise estatística por ANOVA seguida pelo teste de Tukey para comparação das médias. As análises estatísticas foram realizadas pelo programa GraphPad prism, versão 5 (2007) da GraphPad Software.

#### **4.1.8. Correlação entre os teores de derivados fenólicos e a atividade antioxidante pelo método DPPH.**

Para verificar a possível correlação entre os teores médios dos metabólitos secundários, derivados fenólicos, e a atividade antioxidante pelo método DPPH dos extratos e frações semipurificadas de galhos de *Andira nitida*, calculou-se o coeficiente de correlação de Pearson (SAMPAIO, 2012).

#### **4.1.9. Correlação do teor de derivados flavonoídicos expressos em biochanina A e quercetina com os valores TEAC encontrados para as amostras**

Para verificar a possível correlação entre os teores médios dos isoflavonoides e flavonoides e a atividade antioxidante determinada pelo TEAC dos extratos e frações semipurificadas de galhos de *Andira nitida*, calculou-se o coeficiente de correlação de Pearson (SAMPAIO, 2012).

### **4.2. Atividades Biológicas da espécie vegetal *Andira nitida***

#### **4.2.1. Verificação do potencial antioxidante dos extratos e frações**

##### **4.2.1.1. Bioautografia em placa de sílica gel revelada com solução de 1,1-difenil-2-picrilidrazila (DPPH)**

A capacidade antioxidante do extrato hidroalcoólico dos galhos de *A nitida*, suas frações purificadas e o resíduo aquoso resultante do processo de partição foram avaliados quanto à presença de substâncias antioxidante através de bioautografia em CCD sobre sílica gel, revelada com solução de DPPH a 0,2% em metanol. Foram utilizados diversos sistemas eluentes para que fosse encontrado o melhor perfil de separação das amostras.

#### 4.2.1.2. Ensaio espectrofotométrico de redução do radical 1,1-difenil-2-picrilidrazila (DPPH)

O DPPH, quando em solução, tem uma coloração violeta com forte absorção em torno de 515 - 517 nm e apresenta paramagnetismo conferido pelo elétron não emparelhado. Assim, ao receber um elétron, seu elétron passa a ser pareado, tornando-se uma molécula diamagnética e a absorção característica desaparece. A descoloração resultante está relacionada estequiometricamente com o número de elétrons aceitos e, assim, a atividade antioxidante de uma amostra pode ser expressa em função da sua capacidade de provocar um decréscimo na absorção (a 515 - 517 nm) de uma solução de DPPH a uma determinada concentração (BRAND-WILLIAMS et al., 1995).

Para o ensaio, foram preparadas soluções das amostras a serem testadas, em EtOH, em concentrações finais variadas, 50,0 a 2,0 µg / ml, a fim de se verificar a faixa de linearidade.

A solução de DPPH (PM= 394,32) foi preparada na concentração de 0,3mM em EtOH em balão volumétrico de 100 mL e protegido da luz. Foi analisado seu espectro no UV ajustando a concentração da solução para obter-se absorvância inferior a 0,8, no comprimento de onda escolhido, dentre a faixa de 515 a 517 nm. Alíquotas de 2,5 ml de cada uma das soluções de amostra foram transferidas para os frascos (branco e teste), que estavam protegidos da incidência de luz com papel alumínio. A seguir, adicionou-se aos frascos contendo amostras-teste, 1 mL da solução de trabalho de DPPH.

A solução controle do ensaio foi preparada adicionando-se 1 mL das solução de trabalho de DPPH a 2,5 mL de EtOH. Aos brancos de cada solução da amostra, foram adicionados 1 mL de EtOH ao invés de solução de DPPH.

Os frascos foram mantidos ao abrigo da luz por um período de 30 minutos e, então, procederam-se as leituras das absorvâncias no comprimento de onda escolhido. Como controles positivos foram utilizados o extrato seco de *Ginkgo biloba* (75 a 2,5 µg/ml) e quercetina padrão (5 a 0,5 µg / ml).

As amostras foram analisadas em triplicata e a média dos percentuais da AAO (%AAOM) das amostras, em cada uma das concentrações testadas, foi calculada utilizando a seguinte equação:

$$\text{Atividade Antioxidante (\%)} = \left( \frac{A_{\text{Controle}} - A_{\text{Amostra}}}{A_{\text{Controle}}} \right) \times 100$$

Em que  $A_{\text{Amostra}}$  é a absorvância da solução de DPPH com a amostra;  $A_{\text{Controle}}$  é a absorvância do DPPH com EtOH, sem adição amostra.

#### Análise estatística:

A eficiência antirradicalar foi estabelecida utilizando a análise de regressão linear no intervalo de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ). Os resultados foram expressos através do valor da concentração efetiva 50% ( $CE_{50}$ ), que representa a concentração da amostra necessária para neutralizar 50% dos radicais de DPPH. Quanto maior o consumo de DPPH pela amostra, menor será a sua  $CE_{50}$  e maior a sua atividade antioxidante. Os valores de  $CE_{50}$  das amostras foram inicialmente submetidos a análise de variância (ANOVA) e posteriormente ao teste de Tukey para comparação das concentrações médias de cada amostra e destas com as amostras de referência. As análises estatísticas foram realizadas pelo programa GraphPad Prism, versão 5 (2007) da GraphPad Software.

#### **4.2.1.3. Método colorimétrico de redução do $ABTS^{\cdot+}$ (determinação da capacidade antioxidante equivalente ao trolox - TEAC)**

O ensaio TEAC descrito por Van den BERG et al. (1999) e por RE e colaboradores (1999) foi utilizado aqui com pequenas modificações. Uma solução estoque de  $ABTS^{\cdot+}$  foi preparada no dia anterior ao ensaio (12 a 16 horas antes), a partir da mistura de uma solução de sal diamônio do ABTS a 7mM com uma solução de persulfato de potássio (cuja concentração final seja 2,5 mM). Essa solução foi deixada no escuro, por uma noite, para que o radical cátion  $ABTS^{\cdot+}$  fosse formado. A solução de trabalho foi preparada misturando-se a solução estoque de  $ABTS^{\cdot+}$  com metanol de forma que a absorvância em 734 nm fosse  $0,7 \pm 0,02$  (concentração de  $ABTS^{\cdot+}$  aproximadamente de 47  $\mu\text{M}$ ).

Uma solução estoque de Trolox 5 mg/mL em MeOH foi preparada e, a partir da diluição desta, obtiveram-se concentrações-teste variando de 0,75 a 6  $\mu\text{g/mL}$ .

As amostras foram preparadas em diferentes concentrações (0,78 a 50  $\mu\text{g/mL}$ ), sendo o metanol o solvente escolhido. 30  $\mu\text{L}$  de solução amostra ou do padrão Trolox, nas concentrações testadas, foram misturados com 2970  $\mu\text{l}$  da solução de trabalho  $ABTS^{\cdot+}$ . Em seguida, as absorvâncias em 734 nm foram obtidas ( $Abs_{\text{teste}}$ ) em função do tempo (a cada 30 segundos, durante 5 minutos de reação). Uma solução de MeOH (30  $\mu\text{l}$ ) e  $ABTS^{\cdot+}$  (2970  $\mu\text{l}$ )



foi usada como controle ( $Abs_{\text{controle}}$ ). Também foi avaliado um branco do solvente usado nas diluições das amostras e do Trolox (MeOH).

Todas as amostras foram testadas com três repetições independentes.

A unidade de atividade é TEAC, a qual é adimensional, pode ser definida como a concentração milimolar (mmol/l) de Trolox que tem a capacidade antioxidante equivalente a uma solução 1,0 milimolar (mmol/l) da amostra analisada (MILLER e RICE-EVENS, 1996) ou como a concentração da substância antioxidante que dá a mesma porcentagem de inibição da absorvância do ABTS<sup>•+</sup> em 734 nm que uma solução Trolox a 1,0 mM, em um tempo determinado (RE et al., 1999).

$$\% \text{ Inibição} = \frac{Abs_{\text{(controle)}} - Abs_{\text{(teste)}}}{Abs_{\text{(controle)}}} \times 100$$

Para evitar a supra ou subestimação da atividade antioxidante e ter em conta os potenciais efeitos secundários dos produtos antioxidantes, as porcentagens de inibição são calculadas usando-se uma “rede” das áreas integradas sob as curvas de decaimento de absorvância (AUC) para cada concentração de amostra, branco e Trolox, testadas, levando-se em consideração as absorvâncias medidas a 734 nm de 30 em 30 segundos em um tempo total de 5 minutos de reação. Representa-se, assim, o tempo de latência, velocidade inicial, e a extensão total de inibição em um único valor. Os gráficos das porcentagens de inibição assim calculadas *versus* as concentrações testadas foram construídos para obter-se, através do método dos mínimos quadrados, a equação do gráfico, determinando-se desta forma, o coeficiente de inclinação para cada amostra testada e para o Trolox, o qual representa a magnitude da interferência da variante X (concentração) sobre a variante Y (% de inibição da formação do radical ABTS<sup>•+</sup>).

O valor TEAC foi obtido comparando-se o coeficiente de inclinação da amostra em relação ao Trolox.

#### Análise estatística

Após o cálculo do valor de TEAC pelas inclinações das retas do Trolox e das amostras, os valores encontrados foram comparados, inicialmente submetidos a análise de variância (ANOVA) e posteriormente ao teste de Tukey. As análises estatísticas foram realizadas pelo programa GraphPad Prism, versão 5 (2007) da GraphPad Software.

#### 4.2.1.4. Quantificação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico formadas na peroxidação de lipossomos

Esse ensaio visa avaliar a atividade protetora da amostra sobre a peroxidação lipídica de lipossomos de cérebro bovino que tem como um dos produtos finais o malondialdeído. Os lipossomos gerados a partir de cérebro bovino são oxidados usando uma fonte de ferro (cloreto férrico) e ácido ascórbico, resultando na formação de malondialdeído, que reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA) a altas temperaturas (85 – 90<sup>0</sup>C) e em meio ácido, formando um produto de coloração rosa que pode ser detectado em espectrofotômetro, na região de ultravioleta, usando um comprimento de onda de 532 nm.

Esse ensaio avalia a atividade protetora dos extratos sobre a peroxidação lipídica de lipossomos de cérebro bovino (HOUGHTON et al. 1995). Os lipossomos foram gerados a partir de cérebro bovino em tampão fosfato (PBS), incubados com soluções de FeCl<sub>3</sub> 1mM e ácido ascórbico 1mM, na presença das frações em clorofórmio e em hexano (10-0,156 mg/mL), ou dos controles positivos (extrato padronizado de *Ginkgo biloba* e propilgalato 1x10<sup>-4</sup> M) ou na ausência deles, por 20 minutos a 37°C. Em seguida, foram adicionados a todos os tubos solução de BHT a 10% em EtOH (para paralisar a reação de peroxidação lipídica), ácido tiobarbitúrico a 1% p/v em NaOH 50 mM (TBA) e HCl 1%. Os tubos de ensaio foram levados a banho-maria a 85 – 90°C, por 30 minutos. Após resfriamento completo, adicionou-se 2,5 ml de BuOH a todos os tubos. Em seguida, os tubos foram agitados e centrifugados a 3.500 rpm por 10 minutos. As fases butanólicas foram retiradas e transferidas para cubetas e procederam-se as leituras das absorvâncias em λ 532 nm. A adição de um antioxidante impede a formação de radicais livres, portanto, previne a peroxidação lipídica e, conseqüentemente, a intensidade da coloração da solução de reação com ácido tiobarbitúrico diminuirá. A determinação da atividade protetora da amostra sobre a peroxidação dos lipossomos bovinos foi feita através da fórmula abaixo e foi expressa como percentual de inibição:

$$\% \text{ inibição} = 100 \times \frac{(RT - BCO) - (TA - BA - BCO)}{(RT - BCO)}$$

onde,

RT= reação total: é medida numa solução contendo o mesmo solvente usado para dissolver as amostras, lipossomos, FeCl<sub>3</sub> e ácido ascórbico. Nesse caso, mede-se a reação total de peroxidação dos lipossomos.

BCO= branco: o ensaio em branco consta de uma solução contendo apenas lipossomos e água, o que elimina a interferência dos lipossomos na medida da absorvância.

TA = tubo teste amostra: para os tubos testes, acrescenta-se a amostra, lipossomos, FeCl<sub>3</sub> e ácido ascórbico.

BA = branco amostra: elimina interferência da amostra na determinação da absorvância.

Para esse teste, usou-se extrato etanólico padronizado de *Ginkgo biloba* comercial e solução de propilgalato, antioxidantes naturais bastante conhecidos, como referências para comparação e positivo, respectivamente.

### Análise estatística

Através dos logaritmos das concentrações empregadas, o gráfico da % de inibição vs log da concentração foi construído, a fim de que se obtivesse a equação de melhor ajuste para as 3 repetições, através do método dos mínimos quadrados, e desta forma calcular a CE<sub>50</sub> das amostras. O resultado final foi obtido a partir das CE<sub>50</sub> da triplicata que é expresso como a média ± desvio padrão. A análise estatística foi realizada por ANOVA seguida do teste de Tukey para a comparação final das médias.

## **4.2.2. Verificação do potencial antimalárico dos extratos e frações**

### **4.2.2.1 Teste de inibição do crescimento do *P. falciparum* em culturas *in vitro* (Teste LDH)**

Os testes *in vitro* dos extratos, frações e produtos naturais foram realizados em colaboração com a Faculdade de Farmácia, Laboratório de Fitoquímica da UFMG. O experimento foi realizado com hemácias infectadas por *P. falciparum*, clone W2, resistente à cloroquina, através do método do LDH (MAKLER *et al.*,1993). Resumidamente, 20µL de cada diluição dos compostos testados foram colocados em microplacas de 96 poços, em triplicata, onde já se encontravam 180µl da suspensão de hemácias infectadas (2% hematócrito, 1% de parasitemia), provenientes de um cultivo mantido no laboratório de

Bioensaios da UFMG. As placas foram incubadas em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C por 48h na presença dos extratos. Após esse período as microplacas foram congeladas (-20°C por no mínimo 24h), para promover a lise das hemácias. O lisado celular foi transferido para placas de 96 poços, aos quais se adicionaram 100µL de reagente Malstat e 25µL de reagente NBT/PES. Após 1h de incubação, a absorvância das placas foi medida em espectrofotômetro a  $\lambda$  540nm.

Os percentuais de redução do crescimento dos parasitos foram calculados a partir da absorvância.

#### **4.2.2.2. Teste espectrofotométrico de inibição da polimerização da ferritoporfirina (FBIT) ou inibição da polimerização do heme**

Para padronização de tal técnica na Faculdade de Farmácia da UFJF foram usadas amostras cloroquina trazida da Colômbia e cloroquina Merck para comparação, além do teste das várias condições e variáveis (concentração e lotes de hemina, concentrações da cloroquina, tipos de placas, velocidade e força de centrifugação, etc), a fim de estabelecer e otimizar a técnica segundo as condições dos laboratórios da UFJF.

O teste consiste em um ensaio colorimétrico para avaliação da inibição de polimerização do heme proposto por Garavito e colaboradores (2006). Assim, a fim de determinar a CI<sub>50</sub> de cada extrato e fração semipurificada foram preparadas diferentes concentrações que variaram de 40 mg/mL a 0,156 mg/mL, com três repetições.

Em placas de 96 poços, foram acrescentadas em cada poço as soluções: 50 µl de solução de hemina 0,25 mg/mL (recentemente diluída em DMSO), 100 µL de tampão acetato de sódio (pH 4,45) e 50 µL de solução de amostra ou 50 µL de controle (DMSO/cloroquina).

Soluções de cloroquina em diversas concentrações (0,05-0,01 mg/mL), foram dissolvidas em água deionizada, sendo o controle positivo do teste. Como controle negativo foi usado o DMSO. Todas as concentrações foram avaliadas em 8 réplicas.

Após a adição das soluções-reagente e as amostras, as microplacas foram agitadas suavemente por 3 a 5 min e incubadas a 37<sup>0</sup>C por 18-22 horas. Ao final desse período, foram centrifugadas a 800 gravidades durante 5 min. O sobrenadante foi, então, descartado manualmente. O precipitado foi resolubilizado em 200 µL de DMSO para remover o excesso de hemina. Em seguida, as placas foram novamente centrifugadas a 800 g durante 5 min. Em seguida, o sobrenadante foi descartado manualmente, e o precipitado de β-hematina foi dissolvido em 200 µL de solução de NaOH 0,1M na mesma placa, a qual foi levada a agitação

suave por 30 segundos. A quantificação espectroscópica foi realizada em  $\lambda$  405 nm em leitor de microplacas.

A porcentagem de inibição da cristalização de FPIX foi calculada mediante a seguinte equação:

$$\% \text{ Inibição} = 100 \times [(\text{D.O. controle} - \text{D.O. extrato}) / \text{D.O. controle}]$$

Foi considerado ativo um extrato ou fração que apresentou um percentual de inibição da cristalização superior a 50% pelo menos para a concentração mais alta testada.

#### Análise estatística:

Através dos logaritmos das concentrações empregadas, o gráfico da % de inibição vs log da concentração foi construído, a fim de que se obtivesse a equação de melhor ajuste para as 3 repetições, através do método dos mínimos quadrados, e desta forma calcular a  $CE_{50}$  das amostras. O resultado final foi obtido a partir das  $CE_{50}$  da triplicata que é expresso como a média  $\pm$  desvio padrão. A análise estatística foi realizada por ANOVA seguida do teste de Tukey para a comparação final das médias.

#### **4.2.2.3. Teste de Supressão da Parasitemia “*in vivo*” (Teste de Peters)**

O experimento foi realizado em colaboração com o Laboratório de Parasitologia ICB/UFJF, após aprovação pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (n° 055/2011 e 056/2011). O protocolo do teste foi baseado no teste supressivo de Peters (PETERS et al., 1975). As cepas do parasito foram mantidas por passagem de sangue de um camundongo infectado para aquele não infectado. O inoculo de *P. berghei* NK65 foi preparado para  $1 \times 10^5$  parasitos/0,2 mL em solução de meio RPMI e soro fetal bovino. Os camundongos (n=40 animais), fêmeas, pesando cerca de 28 g, foram infectados por via intraperitoneal. Eles foram randomicamente divididos em grupos com cinco animais por gaiola. Após 2h da infecção, os camundongos foram tratados com as amostras por quatro dias, recebendo 0,1 mL/dia por via oral (gavagem) nos dias 1-4. Cada grupo tratado recebeu: G1 - (controle negativo) óleo de gergelim + 5% de DMSO, G2 - Cloroquina 10mg/kg, G3 - FCA 50mg/kg, G4 - FCA 100mg/kg, G5 - FCA 200mg/kg, G6 - FHA 200mg/kg, G7 - EHDA 200mg/kg e G8 - FAEA 200mg/kg. No dia 5°, 7°, 9° e 12° do teste, esfregaços sanguíneos foram produzidos através do sangue obtido da ponta da cauda, sendo fixados com metanol e corados com Giemsa. A

parasitemia foi obtida por contagem em microscópio (aumento de 1000x) sendo determinada pelo número de hemácias infectadas usando como universo a quantidade de hemácias totais que varia de acordo com uma estimativa inicial de parasitemia: < 5%: 4 mil hemácias; 5-10%: 3 mil hemácias; 10-20%: 2 mil hemácias e > 20%: 1 mil.

A supressão da parasitemia foi obtida pela comparação com o grupo controle negativo segundo a fórmula abaixo:

$$\frac{A - B}{A} \times 100$$

Onde A é a média da parasitemia do grupo controle negativo e B é média da parasitemia do grupo tratado.

Com o intuito de se obter dados sobre a sobrevivência dos animais em decorrência do tratamento com as amostras avaliadas, os camundongos foram acompanhados até a morte.

#### Análise estatística:

Gráfico de comparação dos valores médios de porcentagem de inibição de cada grupo testado em cada dia de avaliação da parasitemia (5º, 7º, 9º e 12º) foi construído para comparação dos grupos teste com o grupo controle negativo (tratado com o veículo da amostra) e o grupo controle positivo (tratado com cloroquina a 10mg/Kg de peso do animal).

Para análise estatística dos dados *in vivo* foi utilizado o software GraphPad Prism 5, sendo utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney para comparação entre amostras independentes.

#### **4.2.3. Correlação da atividade antioxidante obtida pela quantificação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (SRAT) e a atividade antimalárica pelo ensaio de inibição da polimerização da ferriprotoporfirina (FBIT), das frações em hexano (FHA) e em clorofórmio (FCA)**

Para verificar a possível correlação entre as atividades biológicas das frações semipurificadas de galhos de *Andira nitida*, calculou-se o coeficiente de correlação de Pearson (SAMPAIO, 2012).

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1. Caracterização Química de *A. nitida***

#### **Obtenção dos extratos e frações semipurificadas a partir dos galhos de *A. nitida***

Os extratos e frações semipurificadas foram obtidos conforme descrito na parte de Material e Métodos (p.44). O extrato hidroalcoólico dos galhos, após concentração sob pressão reduzida, foi liofilização gerando cerca de 80g de liofilizado, o qual foi submetido a extração sólido-líquido com solventes em ordem crescente de polaridade, rendendo 1,44% de fração em hexano (FHA), 2,18% de fração em clorofórmio (FCA), 1,41% de fração em acetato de etila (FAEA) e 8,51% de fração em butanol (FBA). O extrato lipofílico dos galhos e o resíduo proveniente do liofilizado após as partições tiveram rendimento de 0,66% e 37,86%, respectivamente.

#### **Determinação do perfil químico dos extratos e frações semipurificadas por Cromatografia em Camada Delgada**

Uma vez que não se encontrou na literatura consultada, informações sobre a química e atividades biológicas para espécie *A. nitida*, procedeu-se a verificação do perfil químico dos extratos e frações semipurificadas obtidos, a fim de estabelecer parâmetros para a continuidade dos trabalhos. Para tanto, primeiramente foram obtidos diversos cromatogramas das amostras em placas cromatográficas de gel de sílica, eluídas em diferentes sistemas eluentes, visualizadas por diversos reveladores químicos e comparando-se com substâncias de referências de classes de metabólitos secundários (eugenol, cumarina, apigenina, esteróide, terpeno, quercetina, esparteína, catequina, ácido cumárico, ácido tânico), conforme descrito em Material e Métodos pág. 46.

A visualização dos cromatogramas revelados com sulfato cérico, um revelador de uso geral, possibilita avaliar a complexidade das amostras. As soluções de anisaldeído sulfúrico e de vanilina sulfúrica permitem uma melhor visualização dos derivados terpênicos, bem como também para alguns derivados fenilpropanoídicos, como taninos, por apresentar maior sensibilidade a essas classes de metabólitos. A diferença entre esses dois reveladores é que no caso do anisaldeído sulfúrico, pode-se observar fluorescência da maioria das manchas sob luz UV em  $\lambda$  de 365 nm. O uso de solução de cloreto férrico auxilia na verificação da presença de

derivados fenólicos. Já o reagente de difenilboriloxietildiamina em polietilenoglicol (NP-PEG) possibilita evidenciar a presença de derivados cumarínicos e flavonoídicos. Estes últimos se mostram como manchas fluorescentes de colorações que variam de acordo com a estrutura química do flavonoide. A pesquisa de derivados alcaloídicos e cumarínicos foi feita com o uso dos reagentes de Dragendorff e hidróxido de potássio, respectivamente.

Com base na análise dos cromatogramas (Rf, coloração) e comparando-se com as amostras referências, foram identificados predominantemente metabólitos secundários de origem fenólica como os derivados flavonoídicos, visualizados através de manchas amarelo-alaranjadas dotadas de leve fluorescência após a revelação com NP-PEG. Derivados terpênicos e esteroidais puderam ser visualizados como manchas roxas/róseas após revelação com anisaldeído e vanilina sulfúricos. Além dessas substâncias também foi visualizada a presença de taninos pela coloração escura na revelação com cloreto férrico (Tabela 2). Constatou-se, ainda, a ausência de alcaloides e derivados cumarínicos no extrato bruto hidroalcoólico de *A. nitida* e em suas frações semipurificadas. Estes resultados estão em conformidade com a literatura científica na qual os estudos mostram que no gênero *Andira* predominam os derivados fenólicos como as isoflavonas (GARCEZ et al., 2010; SILVA et al. 2008; SILVA et al., 2006; KRAFT et al., 2000). Dessa forma, tem-se proposto usar as isoflavonas como marcadores taxonômicos deste gênero (SILVA et al., 2006).

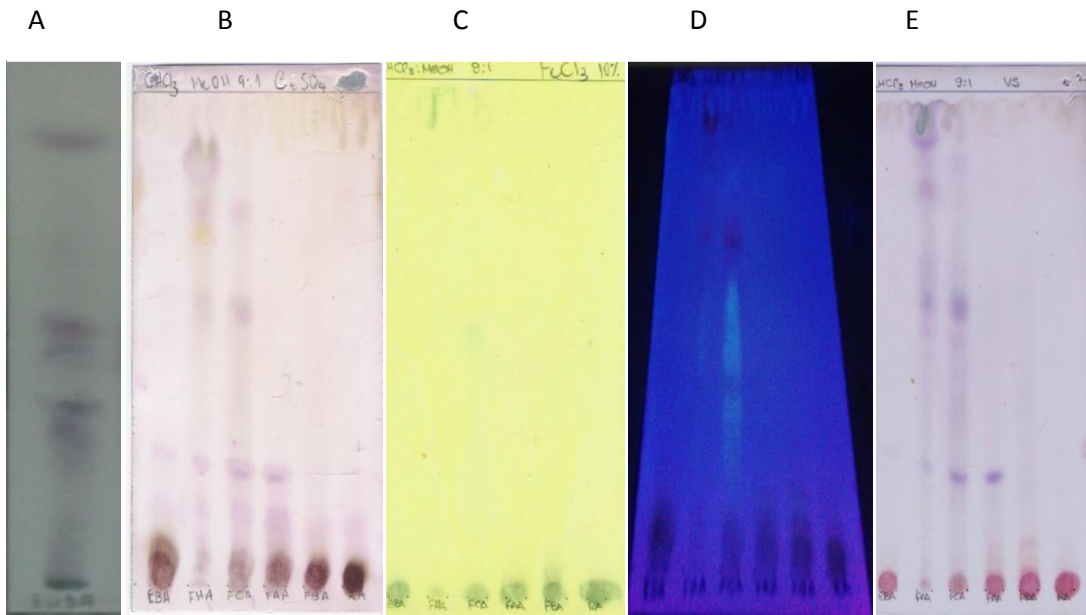
O sistema eluente MeOH:CHCl<sub>3</sub> 9:1 foi escolhido para ilustração do perfil químico qualitativo das amostras (Figura 24) e padrões (Figura 25).

**Tabela 2:** Prospecção fitoquímica dos extratos e frações semipurificadas de *Andira nitida*.

Classe de metabólitos secundários							
	EHDA	EEAA	FHA	FCA	FAEA	FBA	REEAA
Terpenos/Esteroides	+	+	+	+	+	-	-
Alcaloides	-	-	-	-	-	-	-
Cumarinas	-	-	-	-	-	-	-
Flavonoides	-	+	-	+	+	+	+
Derivados fenólicos	-	+	-	+	+	+	+

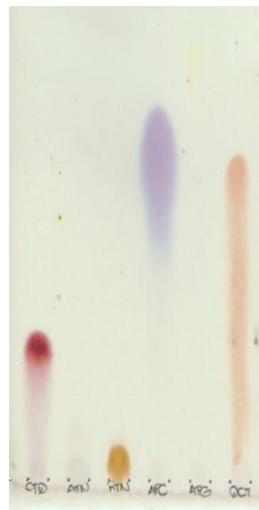
(+): presença; (-): ausência. EHDA: extrato lipofílico dos galhos de *A. nitida*, EEAA: extrato hidroalcoólico de *A. nitida*, FHA: fração em hexano do EEAA, FCA: fração em clorofórmio do EEAA, FAEA: fração em acetato de etila do EEAA, FBA: fração em butanol do EEAA, REEAA: resíduo resultante do fracionamento do EEAA.





**Cromatograma A: extrato lipofílico. Cromatogramas B, C, D e E: da esquerda para a direita nas cromatoplasas foram aplicadas: EEAA, FHA, FCA, FAEA, FBA e REEA**

**Figura 24:** Cromatogramas dos extratos e frações obtidos dos galhos de *A. nitida*. Sistema eluente:  $\text{CHCl}_3$ :MeOH 9:1. Reveladores utilizados (A): anisaldeído sulfúrico, (B) sulfato cérico, (C):  $\text{FeCl}_3$ , (D): NP/PEG e (E): vanilina sulfúrica



**Da esquerda para a direita no cromatoplasca foram aplicados: catequina, ácido tânico, rutina, ácido p-cumárico, apigenina e quercetina.**

**Figura 25:** Cromatograma dos padrões. Sistema eluente:  $\text{CHCl}_3$ :MeOH 9:1. Revelador vanilina sulfúrica

### Verificação do perfil cromatográfico das amostras por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Para melhor e mais segura confirmação do perfil químico do extrato hidroalcoólico bruto dos galhos de *A. nitida* e suas frações semipurificadas, buscou-se estabelecer as condições adequadas na técnica de CLAE-DAD, comparando-se com substâncias de referências de subclasses de derivados fenólicos (orientina, isoorientina, apigenina, canferol, vitexina, delfinidina, (-) epigallocatequina, (-) galocatequina, ácido gálico, paulownina, luteolina, formononetina, 7,3'-diidroxí-4'-metoxiisoflavona, quercetina 3 $\beta$ -glicosilada, entre outros). Para tanto, foram testadas diferentes composições de fase móvel e diferentes condições cromatográficas (temperatura, volume de injeção, fluxo, tempo de corrida, atenuação, sensibilidade, entre outros), conforme descrito em Material e Métodos pág. 47.

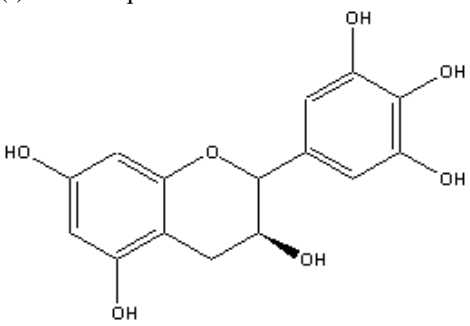
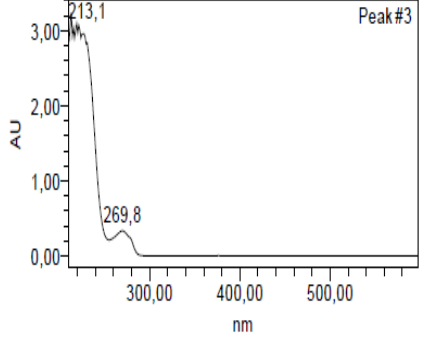
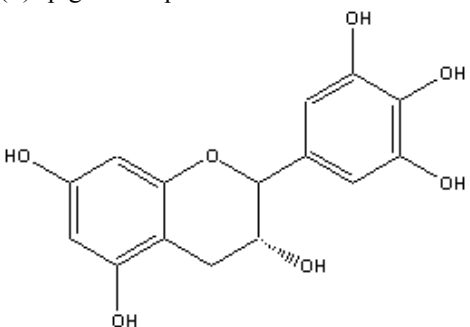
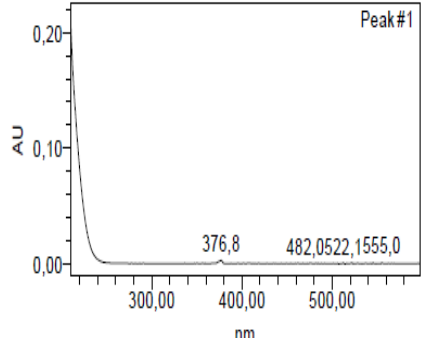
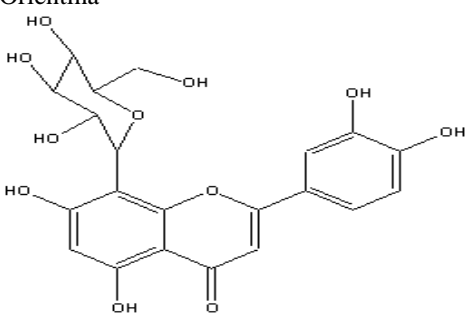
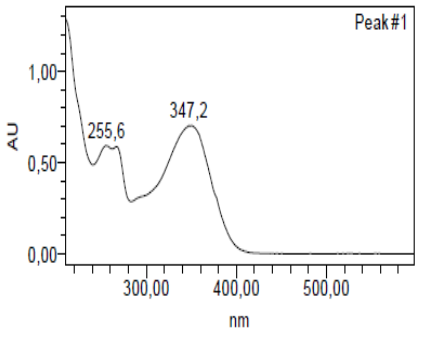
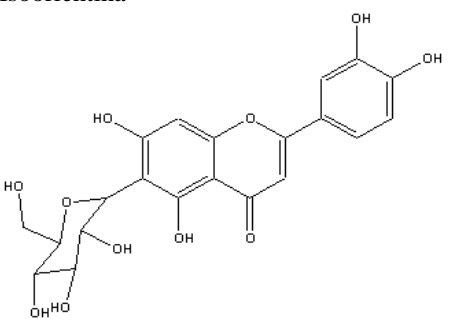
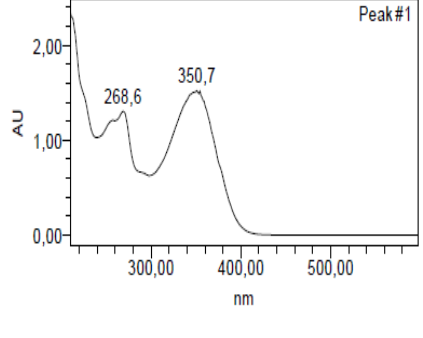
As análises foram realizadas no laboratório de Fitoquímica da Faculdade de Farmácia da UFMG, em um Sistema de cromatografia de alta eficiência (LC-DAD) Waters modelo 2695 com detector de arranjos de diodos modelo 2996, equipado com degaseificador a vácuo, bomba quaternária, injetor de amostra automático e forno para coluna. 10  $\mu$ L das soluções das amostras (a 10mg/mL) e das substâncias de referência (1 a 0,5mg/mL) foram injetadas em uma coluna de sílica de fase inversa (RP18: LiChrospher® 100, 5 $\mu$ m), 125 x 4 mm, Merck. Das várias condições testadas, a que mostrou melhor resolução dos cromatogramas e, portanto, a escolhida para obter os perfis das amostras foi: gradiente de eluição H<sub>2</sub>O:ACN acidificados com 1% de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,1N, com fluxo de 1mL/min, temperatura da coluna a 40 °C. Os cromatogramas foram obtidos *online* na faixa de comprimento de onda de 210 a 600 nm e foram processados no comprimento de onda de 280 nm.

Os cromatogramas do extrato bruto (EEAA), frações em acetato de etila e em butanol, bem como o resíduo aquoso, mostraram-se bastante semelhantes. Demonstraram a predominância de derivados fenólicos, especialmente, flavonoides e derivados fenólicos oligoméricos, fato este já esperado com base na análise prévia por CCD e dos dados disponíveis na literatura científica (KRAFT et al., 2000 e 2001; SILVA et al., 2006 e 2008; GARCEZ et al., 2010) para o gênero *Andira*. A fração em clorofórmio, como já era esperado, mostrou cromatograma com inúmeros sinais, mas referente a substâncias de menor polaridade, apresentando maiores tempos de retenção.

A análise do delineamento apresentado nos espectros de ultravioleta e dos tempos de retenção das amostras em comparação com aqueles das substâncias de referência, permite

inferir algumas propostas para os perfis cromatográficos das amostras analisadas. Os espectros de UV juntamente com os respectivos tempos de retenção das amostras de referência encontram-se sumarizados na Figura 26 a, b e c.

Além dos dados espectrais obtidos das substâncias de referência, foram utilizados para comparação, dados de UV de isoflavonas já descritas para o gênero *Andira*, uma vez que o gênero se caracteriza pela riqueza desses derivados flavonoídicos, como a Fremontina  $UV_{Max}$  (MeOH) 259, 292 nm; Glicirrisoflavona  $UV_{Max}$  (MeOH) 261, 292 nm, Calicosina  $UV_{Max}$  (MeOH) 248, 260, 290 nm, 5,7,3',4'-Tetraidroxi-2'-(3,3-dimetilalil)isoflavona  $UV_{Max}$  (MeOH) 210, 260, 285 nm (SALEM & WERBOVETZ, 2006). O derivado triglicosídeo, biochanina A 7-O- $\beta$ -D-apiofuranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glicopiranosídeo, isolado de *Andira inermis* apresenta dados de  $UV_{max}$  (MeOH) em 207, 261 e 324 nm, os quais não se modificaram ao serem tratados com  $AlCl_3/HCl$  (SILVA, 2000). Para a ( $\pm$ )-5,7-diidroxi-4'-metoxiisoflavona de *Andira parviflora* Ducke, os pesquisadores Braz Filho e colaboradores (1973) atribuíram os valores de UV ( $\lambda_{max}$ EtOH) em 222, 294 e 330 nm. Nota-se que a absorção entre 285-290 parece ser típica das isoflavonas, o que se repete com frequência entre os espectros das substâncias presentes nas amostras de *A. nitida*, o que dá indício da presença dessa subclasse de substâncias.

Substância	Tempo de Retenção (min)	Espectro UV
(-)Galocatequina 	2,149	
(-)Epigalocatequina 	6,170	
Orientina 	6,649	
Isoorientina 	6,464	

**Figura 26 a)** Tempo de retenção e espectro de UV das substâncias de referências – CLAE.

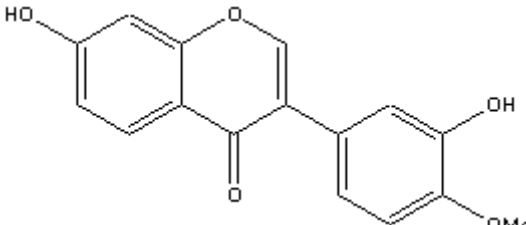
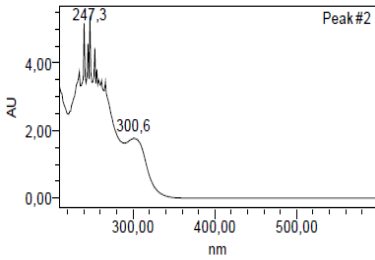
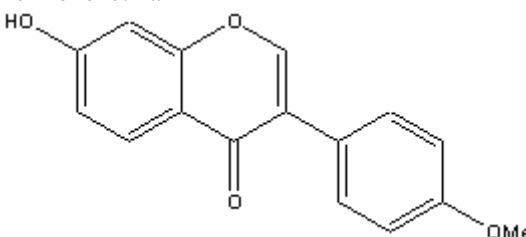
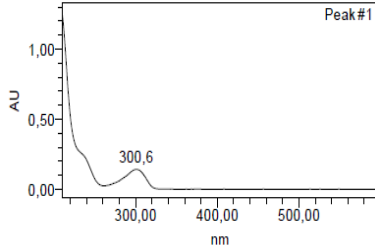
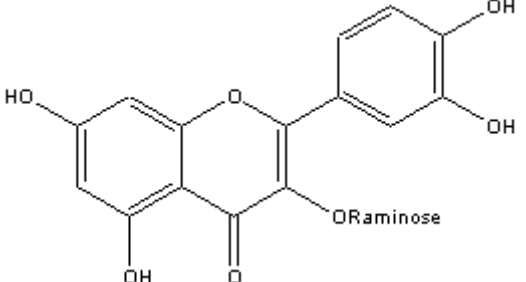
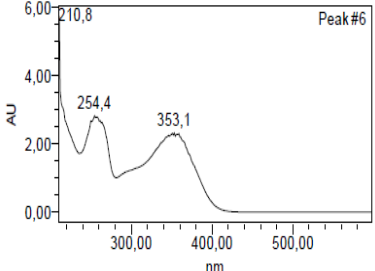
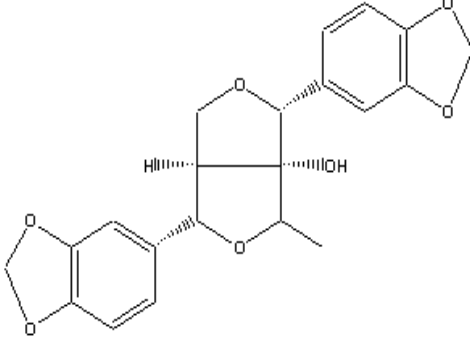
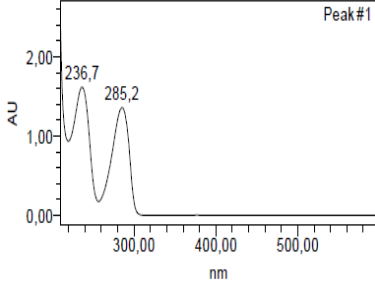
Substância	Tempo de Retenção (min)	Espectro UV
<p>7,3'-diidroxí-4'-metoxiisoflavona</p> 	15,323	
<p>Formononetina</p> 	20,488	
<p>Quercetina-3<math>\beta</math>-glicosilada</p> 	8,747	
<p>Paulownina</p> 	20,437	

Figura 26 b) Tempo de retenção e espectro de UV das substâncias de referência – CLAE.

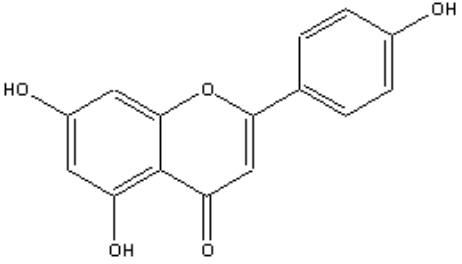
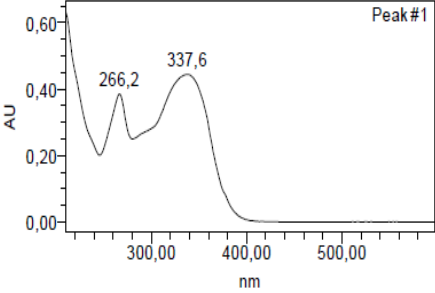
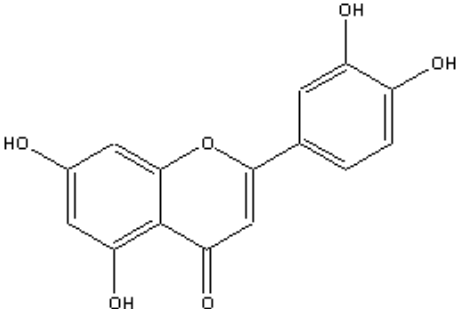
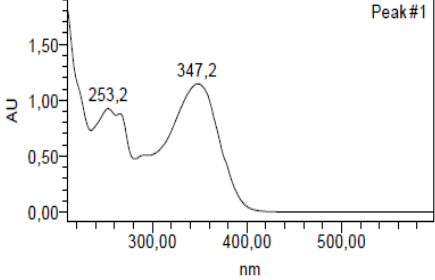
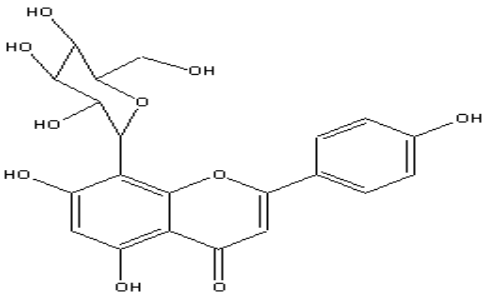
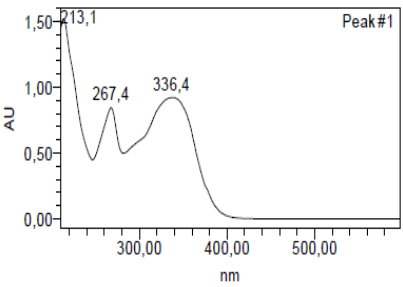
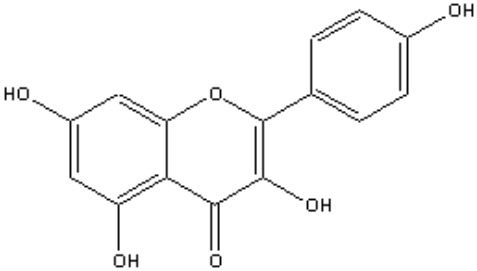
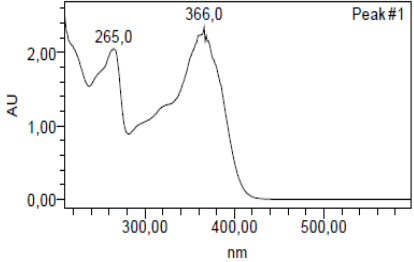
Substância	Tempo de Retenção (min)	Espectro UV
<p>Apigenina</p> 	17,475	
<p>Luteolina</p> 	14,537	
<p>Vitexina</p> 	7,772	
<p>Canferol</p> 	17,361	

Figura 26 e) Tempo de retenção e espectro de UV das substâncias de referência – CLAE.

A análise dos espectros de UV dos sinais (tempo de retenção), em comparação com as substâncias de referência e com base na literatura (MABRY et al., 1970), nos permite inferir que é possível visualizar espectros de UV que caracterizam, predominantemente, derivados flavonoídicos e fenólicos oligoméricos como flavonoides condensados e outros derivados, como ácidos fenólicos simples ( $C_6C_1$ ,  $C_6C_3$ ), isoflavonas, lignanas, flavonas, entre outros.

O cromatograma de EEAA (Figura 27), apesar de mostrar menor resolução, apresenta grande semelhança com os cromatogramas de FBA (Figura 31) e de FAEA (Figura 29). Além disso, constata-se que os cromatogramas das amostras FBA e FAEA mostram também bastante semelhança química, inclusive apresentam os sinais de maior abundância nos tempos de retenção próximos e seus espectros de UV muito semelhantes (Tabela 3).

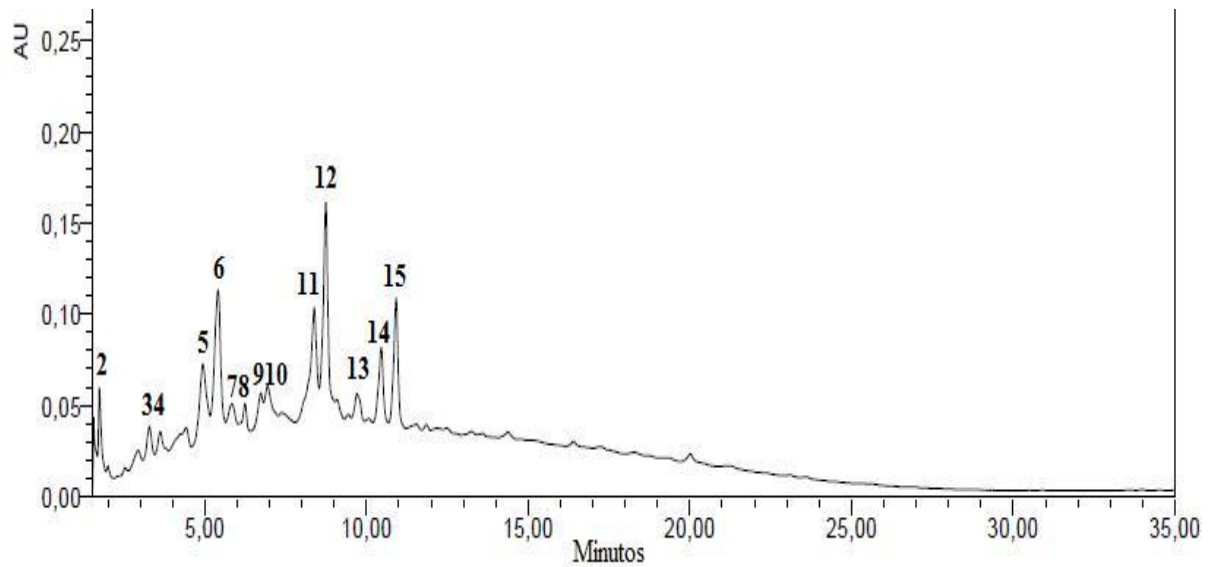
**Tabela 3:** Comparação dos tempos de retenção (TR) das substâncias presentes nos cromatogramas da Fração Butanólica (FBA), Fração Acetato de Etila (FAEA) e Extrato bruto hidroalcoólico de *A. nitida* (EEAA).

FBA / TR (min)	% Área	FAEA / TR (min)	% Área	EEAA / TR (min)	% Área
4,948	7,10	4,92	4,61	4,941	10,32
5,446	9,29	5,397	9,16	5,406	17,58
8,43	12,34	8,362	11,36	8,383	12,25
8,812	23,84	8,724	28,96	8,74	16,90
9,82	4,17	9,686	4,39	9,708	2,43
10,555	8,43	10,445	11,48	10,456	6,52
11,073	11,92	10,90	18,67	10,915	10,18
<b>Total (%)</b>	<b>77,09</b>		<b>88,63</b>		<b>76,18</b>

O cromatograma do extrato bruto hidroalcoólico (EEAA) e os espectros das substâncias encontram-se nas Figuras 27 e 28 a e b, respectivamente. No cromatograma de EEAA, apesar da baixa resolução, foi possível avaliar as substâncias presentes sugerindo a elas classificações. Os espectros de UV, apesar de não serem uma prova definitiva, podem nos levar a sugerir, com base na comparação com substâncias de referência e literatura. Os picos 1, 3, 4, 5, 6, 7 e 11 sugerem serem derivados de catequina (flavan-3-ol). A substância 2 parece ser um ácido fenólico, já o pico 8 sugere ser uma flavona.

O pico 12, 13 e 14 podem ser flavanonas ou isoflavonas, já o pico 15 sugere a presença de um composto lignóide. Os espectros das substâncias 9 e 10 apesar de mal resolvidos, indicam a presença de substâncias fenólicas.

Os espectros de UV juntamente com os tempos de retenção das substâncias presentes no extrato hidroalcoólico se encontra sumarizadas na Figura 28 a e b.



**Figura 27:** Cromatograma do extrato bruto hidroalcoólico de *A. nitida* (EEAA).



Espectros de UV e Tempos de Retenção das substâncias do Extrato Hidroalcoólico de *A. nítida*

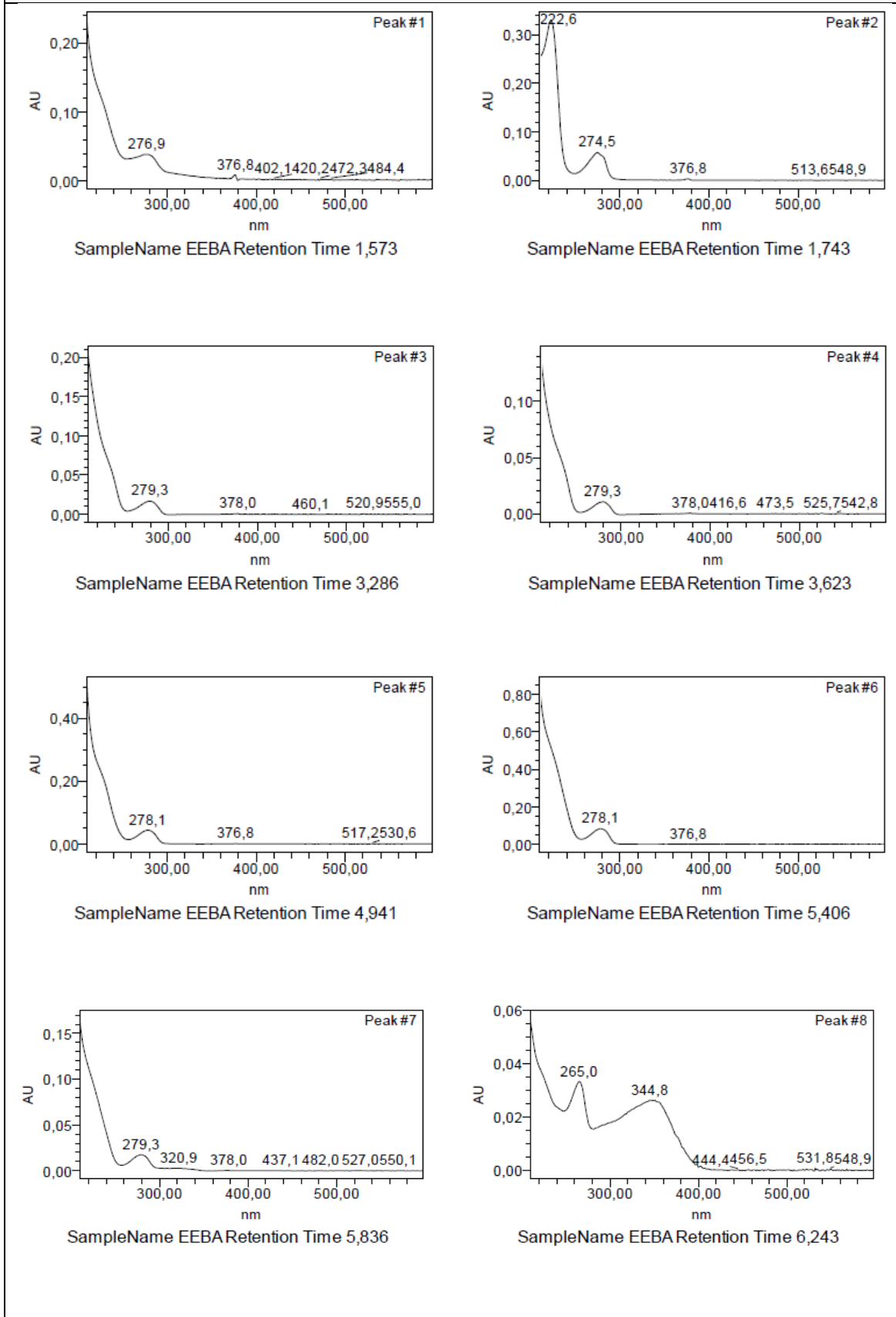
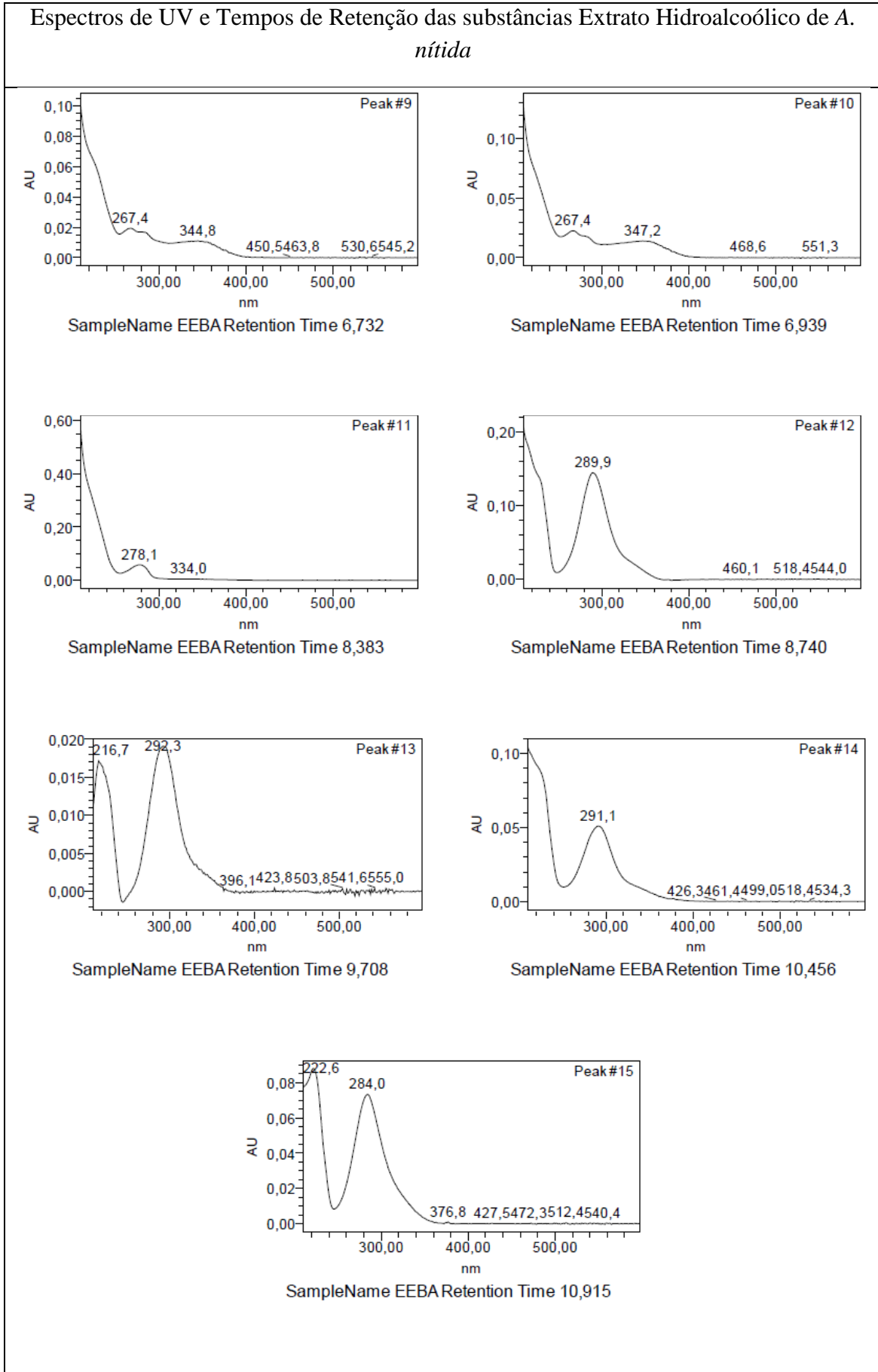
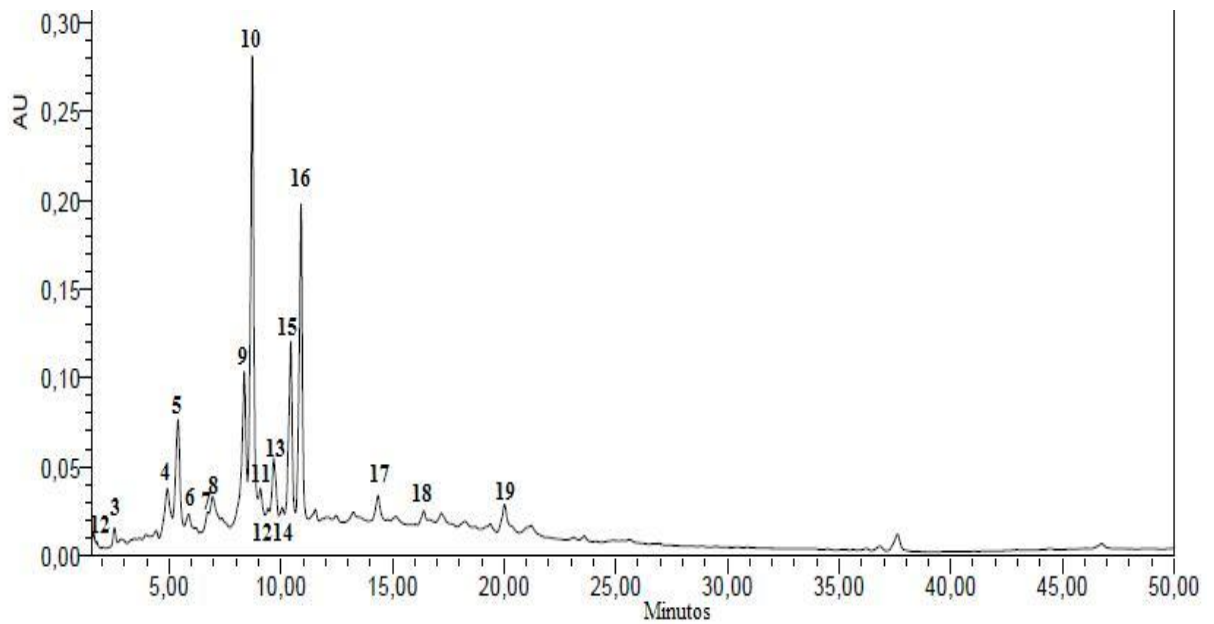


Figura 28 a) Espectros de UV das substâncias do extrato hidroalcoólico de *A. nítida* (EEAA).



**Figura 28 b)** Espectros de UV das substâncias do extrato hidroalcoólico de *A. nítida* (EEAA).

Na fração em acetato de etila (FAEA), as substâncias presentes sugerem ser: ácidos fenólicos (picos 2 e 3), flavan-3-ol (4, 5, 8 e 9, flavanonas/isoflavonas (12, 13, 15), flavonol (14), lignana (16) e isoflavonas (17 e 19). As substâncias 1, 6, 7, 11 e 18 mostram-se como derivados fenólicos, mas os espectros não obtiveram boa resolução. O cromatograma e os espectros de UV das substâncias são apresentados na Figura 29 e 30 a e b, respectivamente.



**Figura 29:** Cromatograma da fração em acetato de etila (FAEA).

Espectros de UV e Tempos de Retenção das substâncias da fração Acetato de Etila do extrato hidroalcoólico de *A. nítida*

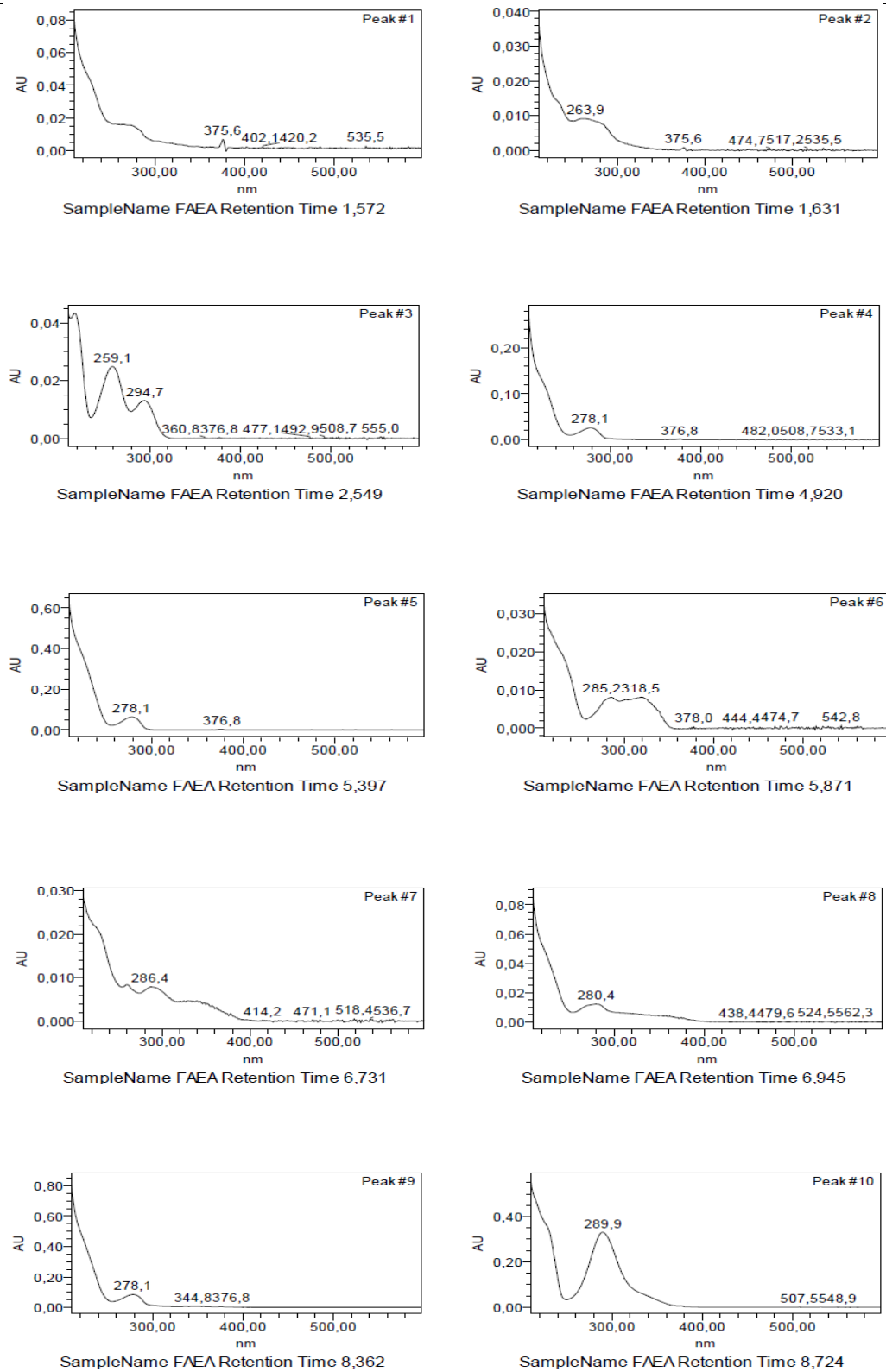


Figura 30 a) Espectros de UV das substâncias majoritárias da fração em acetato de etila (FAEA).

Espectros de UV e Tempos de Retenção das substâncias da fração em acetato de etila do extrato hidroalcoólico de *A. nitida*

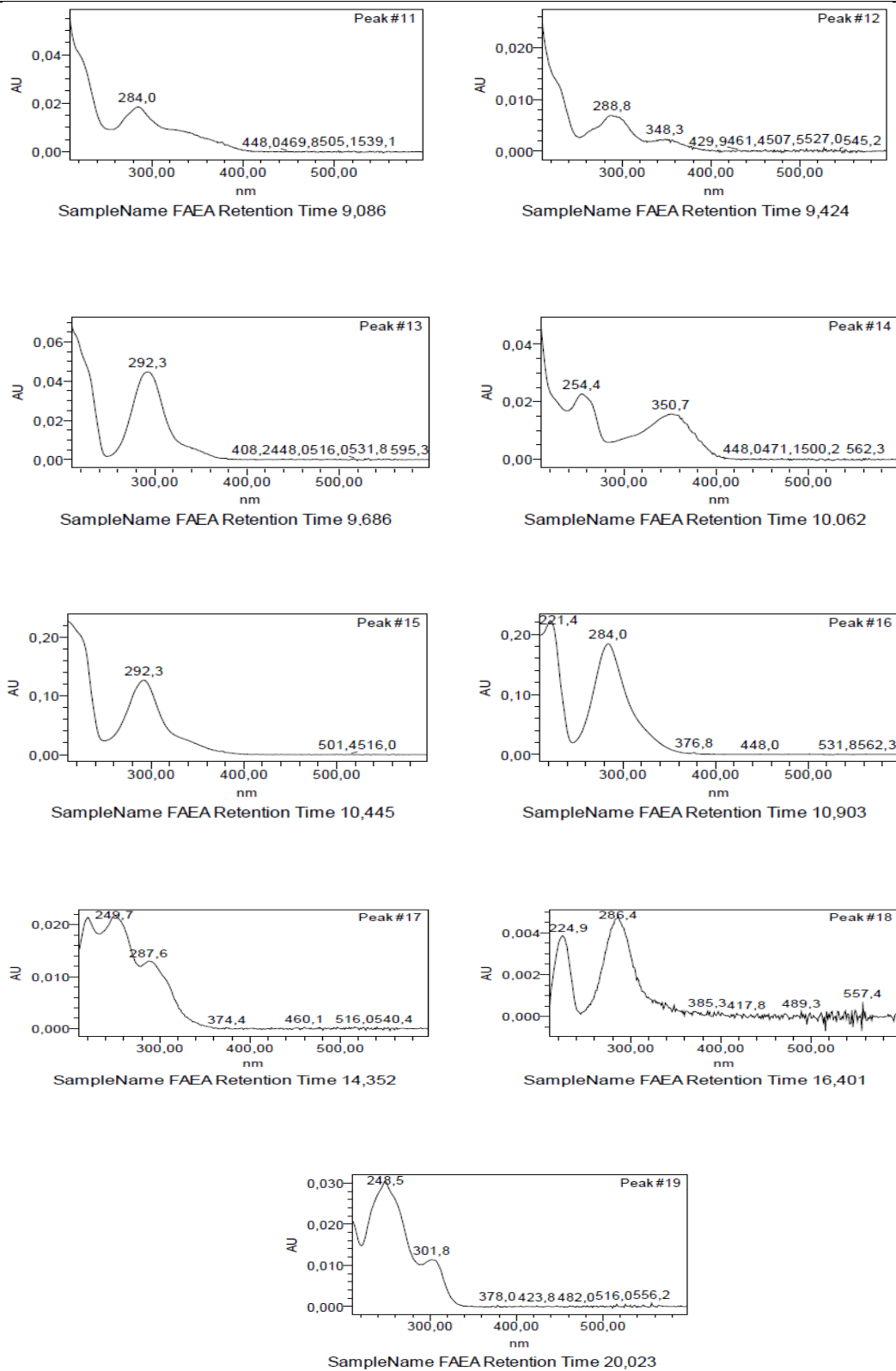
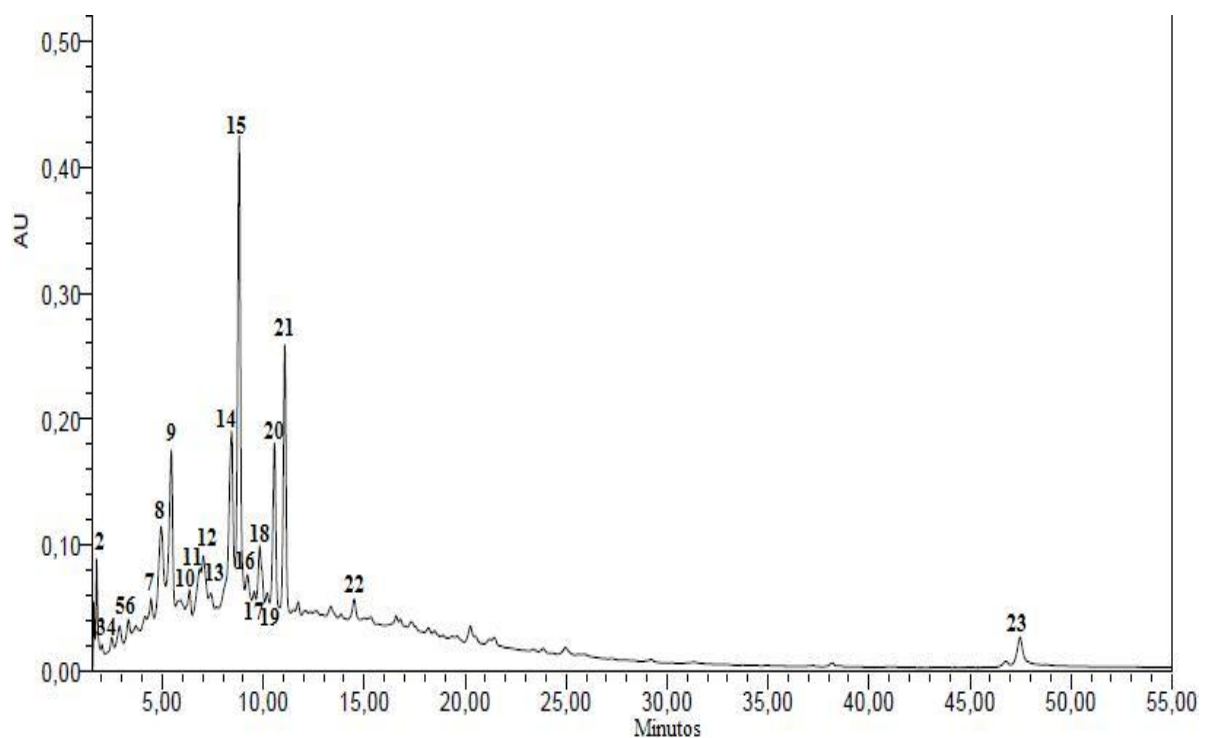


Figura 30 b) Espectros de UV das substâncias majoritárias da fração em acetato de etila (FAEA).

Após a análise dos espectros de UV das substâncias presentes na fração em butanol (FBA) pode-se sugerir a presença de derivados fenólicos de variados tipos sendo eles: ácidos fenólicos (2 e 4), derivado flavan-3-ol (1, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 13 e 14), flavonol (10 e 19), flavona (16), flavanona/isoflavona (15, 18 e 20), isoflavona (22), lignana (21). As substâncias 11, 12 e 23 apresentam espectros mal resolvidos não sendo possível atribuir classificação química a elas. O cromatograma da fração em butanol está representado na Figura 31 e as substâncias presentes nesta fração na Figura 32 a, b e c.



**Figura 31:** Cromatograma da fração em butanol (FBA).

Espectros de UV e Tempos de Retenção das substâncias da fração em butanol do extrato hidroalcolóico de *A. nitida*

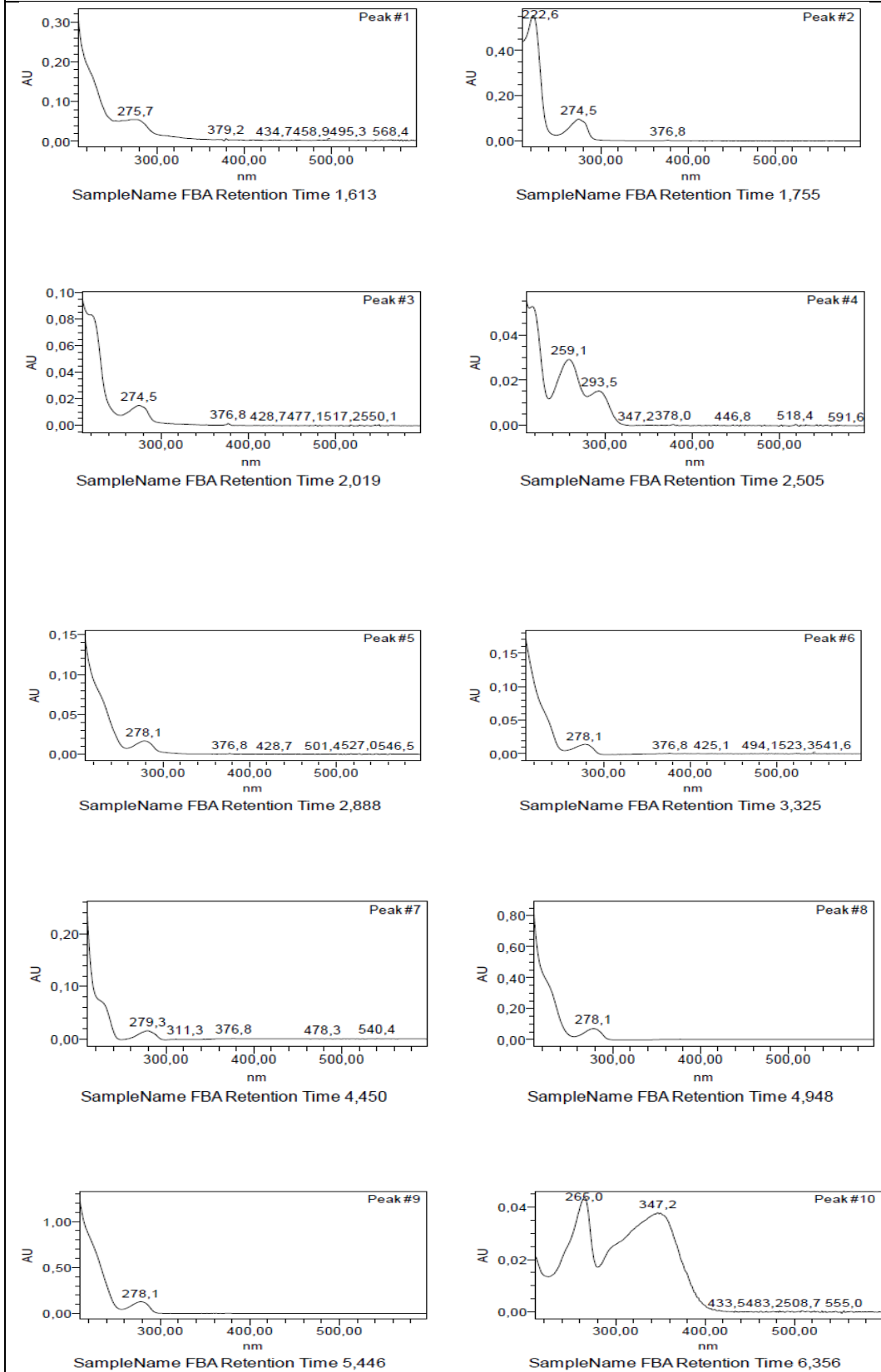
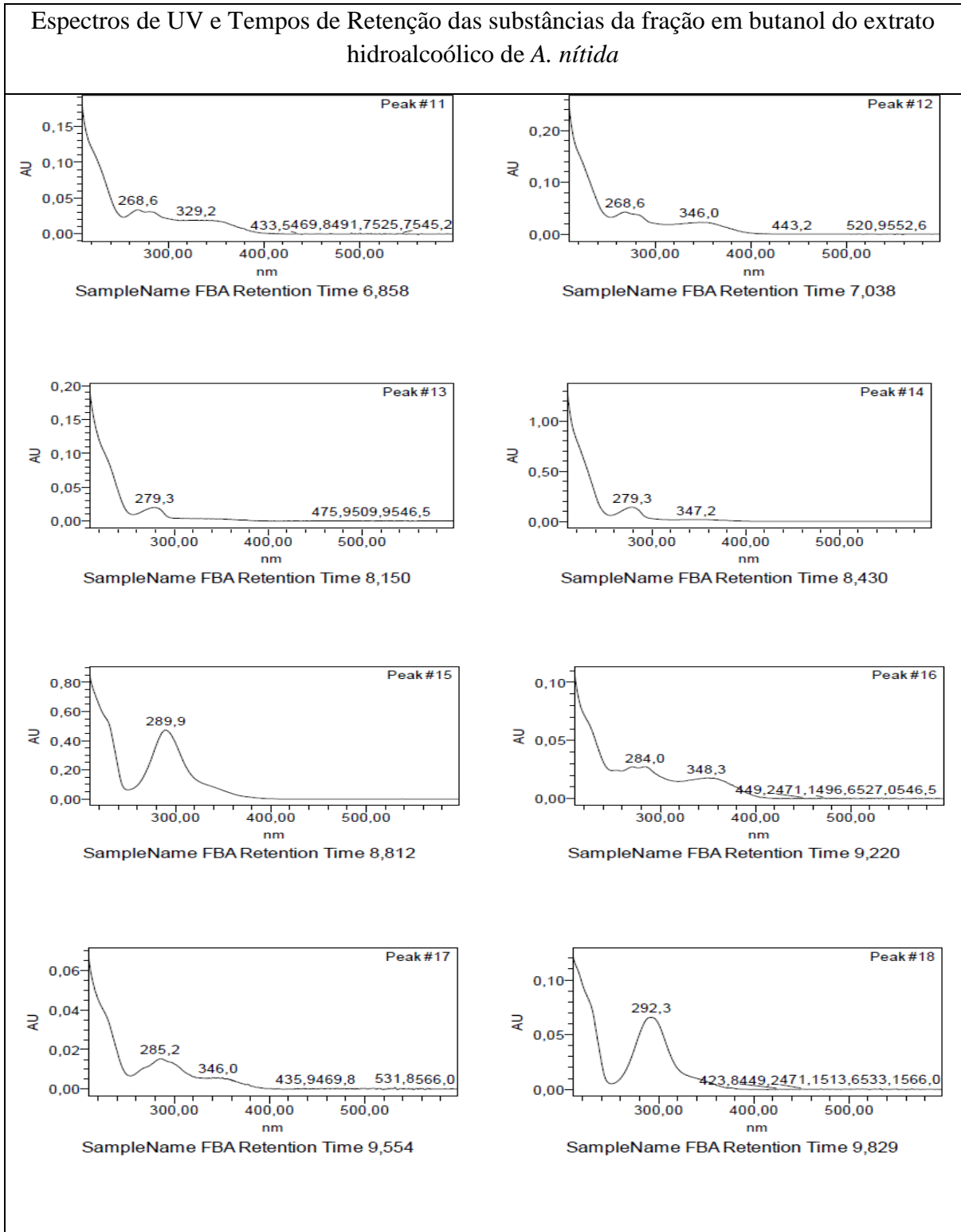
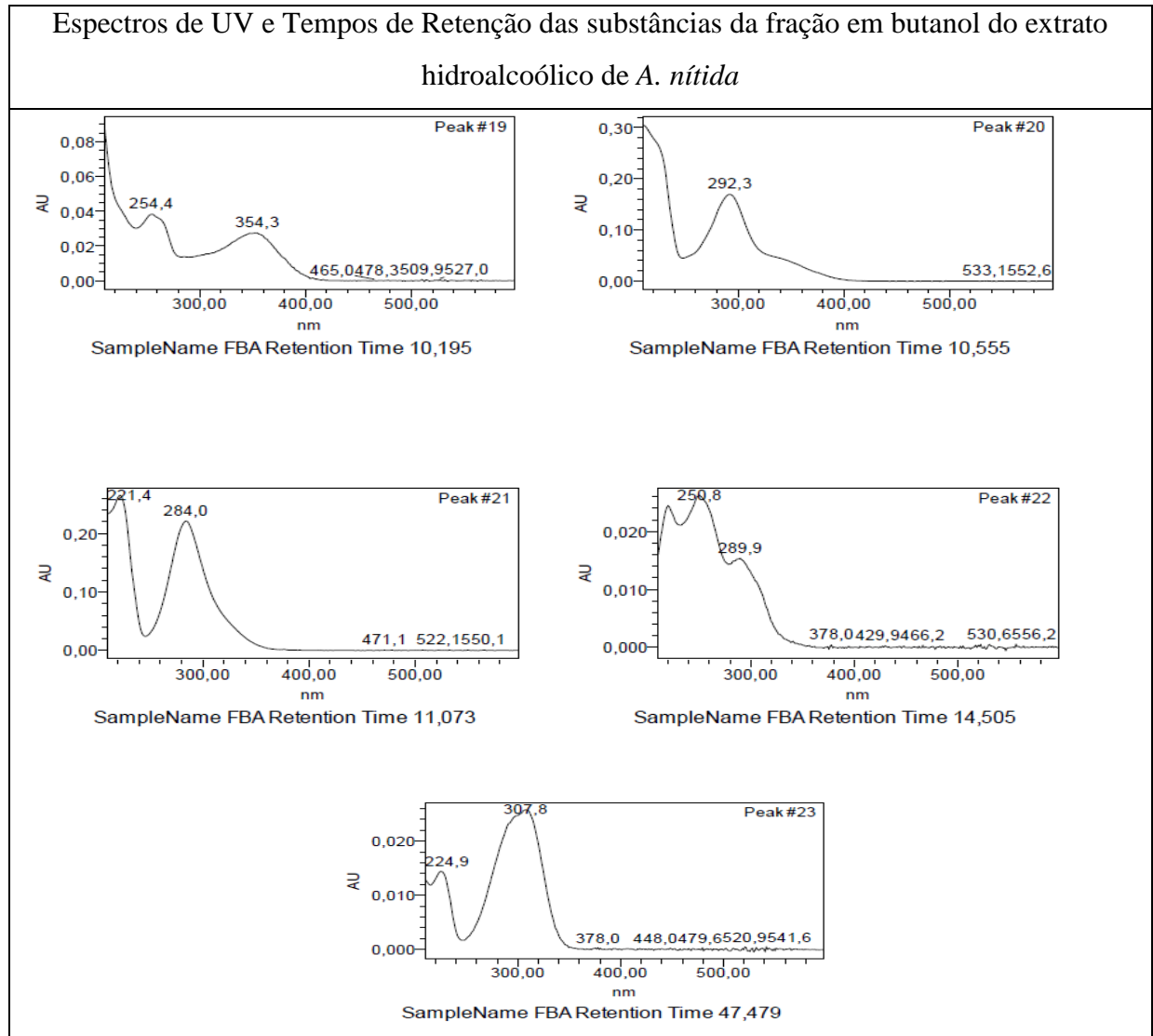


Figura 32 a) Espectros de UV das substâncias majoritárias da fração em butanol (FBA).



**Figura 32 b)** Espectros de UV das substâncias majoritárias da fração em butanol (FBA).

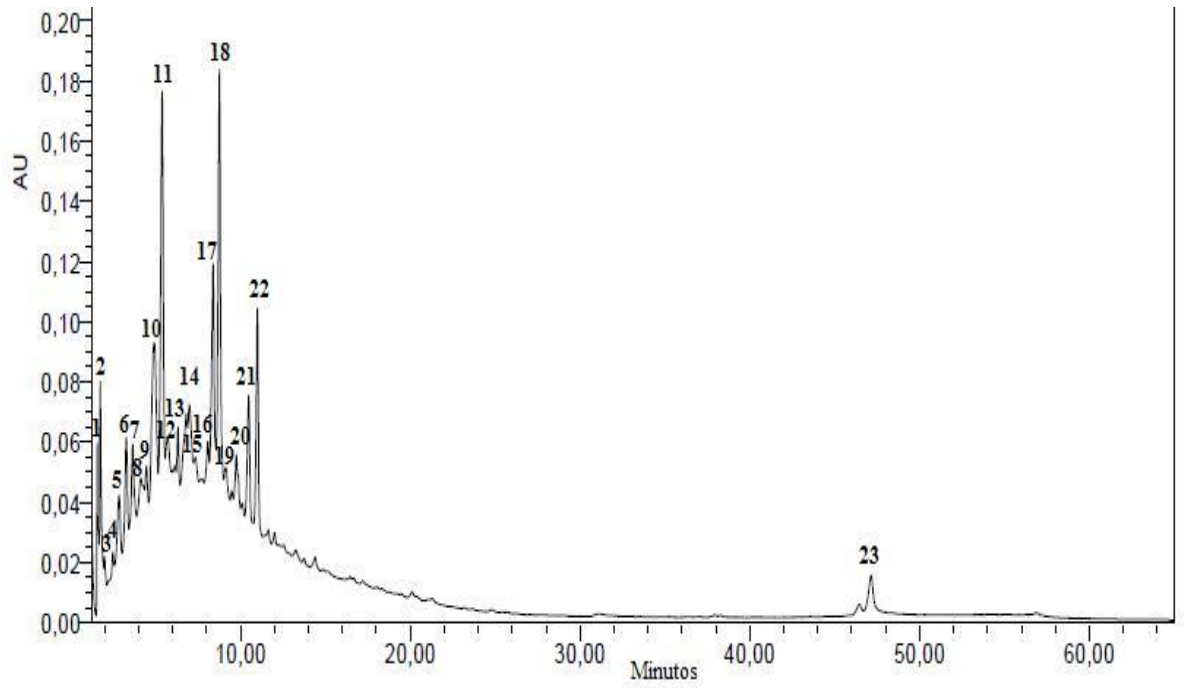




**Figura 32 c)** Espectros de UV das substâncias majoritárias da fração em butanol (FBA).

O cromatograma do Resíduo do extrato bruto hidroalcoólico liofilizado após as partições (REEAA) (Figura 33) apresentou bastante semelhança com a fração em butanol (FBA). Os espectros de UV das substâncias 1, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 16 e 17 sugerem a presença de derivados flavan-3-ol, já 2 e 4 são indicativos de ácidos fenólicos, 13 mostra-se semelhante a um flavonol, 18, 20 e 21 assemelham-se a flavanonas/isoflavanos, 19 flavonol e 22 parece ser uma lignana. As substâncias 14, 15 e 23 não puderam ser identificadas.

O cromatograma do REEAA encontra-se na Figura 33 e os espectros de UV das substâncias presentes encontram-se na Figura 34 a, b e c.



**Figura 33:** Cromatograma do resíduo do liofilizado após as partições (REEAA).

Espectros de UV e tempos de retenção das substâncias presentes no resíduo obtido após as partições do extrato hidroalcoólico liofilizado de *A. nítida*

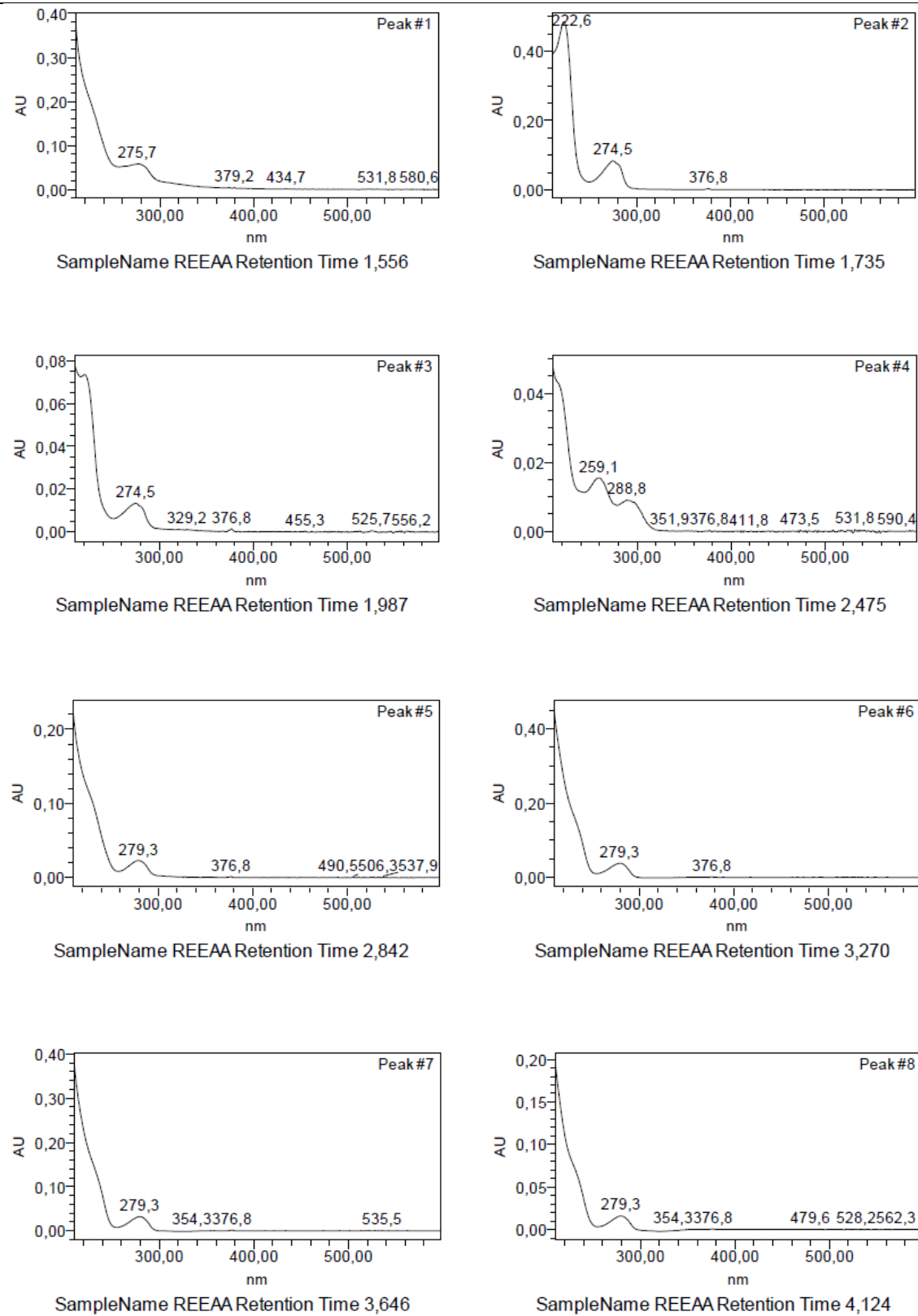
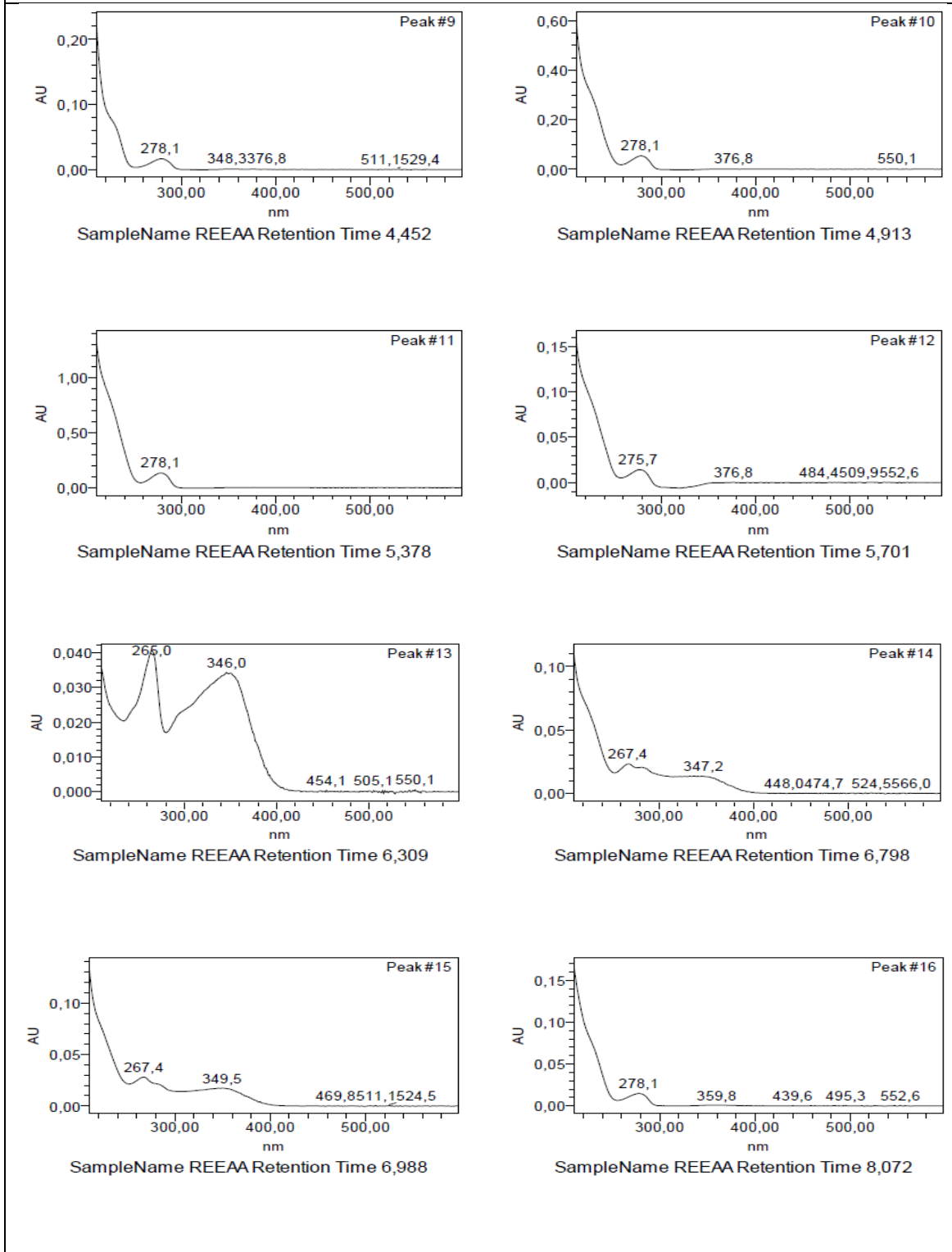
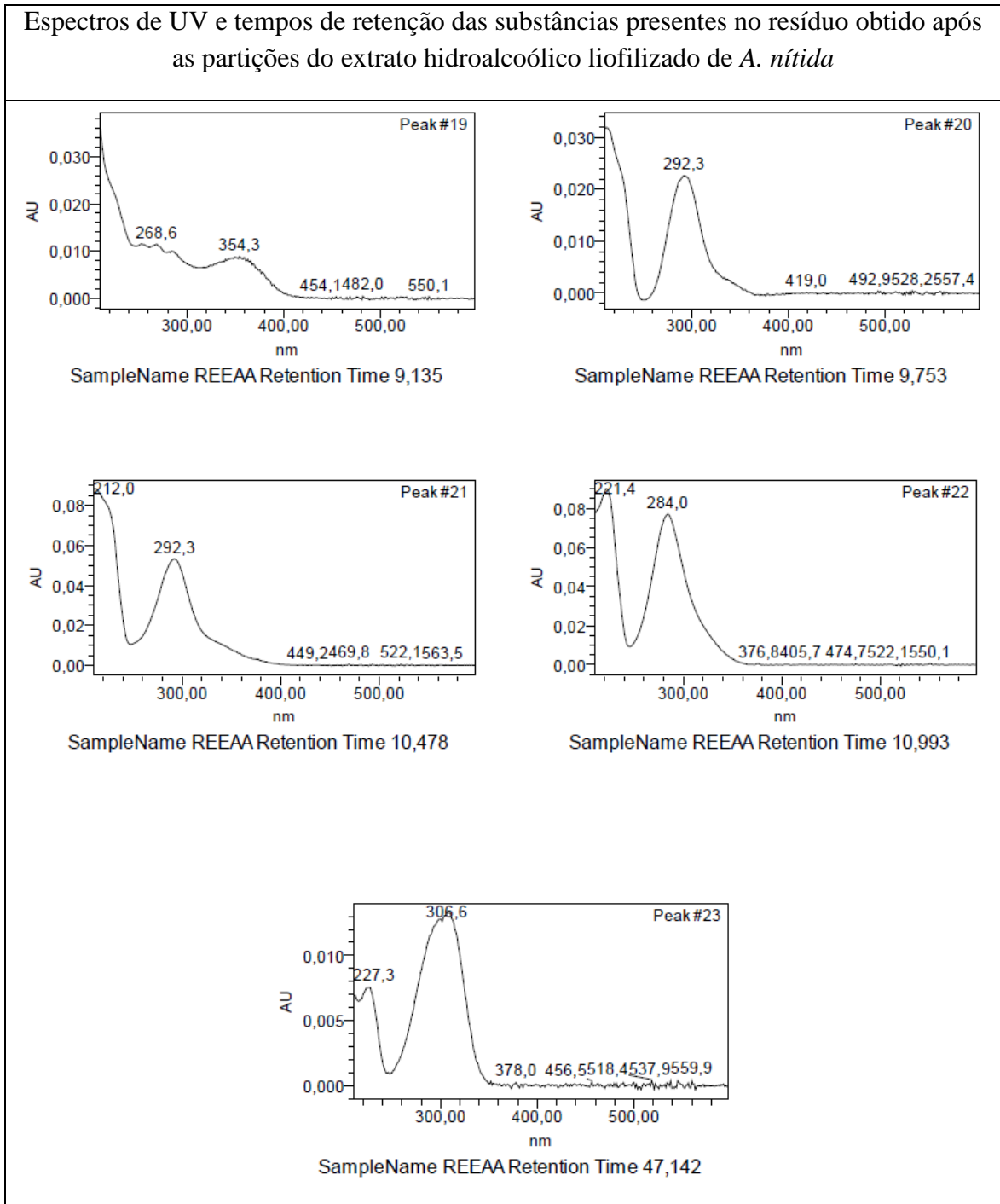


Figura 34 a) Espectros de UV das substâncias majoritárias do resíduo do liofilizado após as partições (REEAA).

Espectros de UV e tempos de retenção das substâncias presentes no resíduo obtido após as partições do extrato hidroalcoólico liofilizado de *A. nítida*



**Figura 34 b)** Espectros de UV das substâncias majoritárias do resíduo do liofilizado após as partições (REEAA).

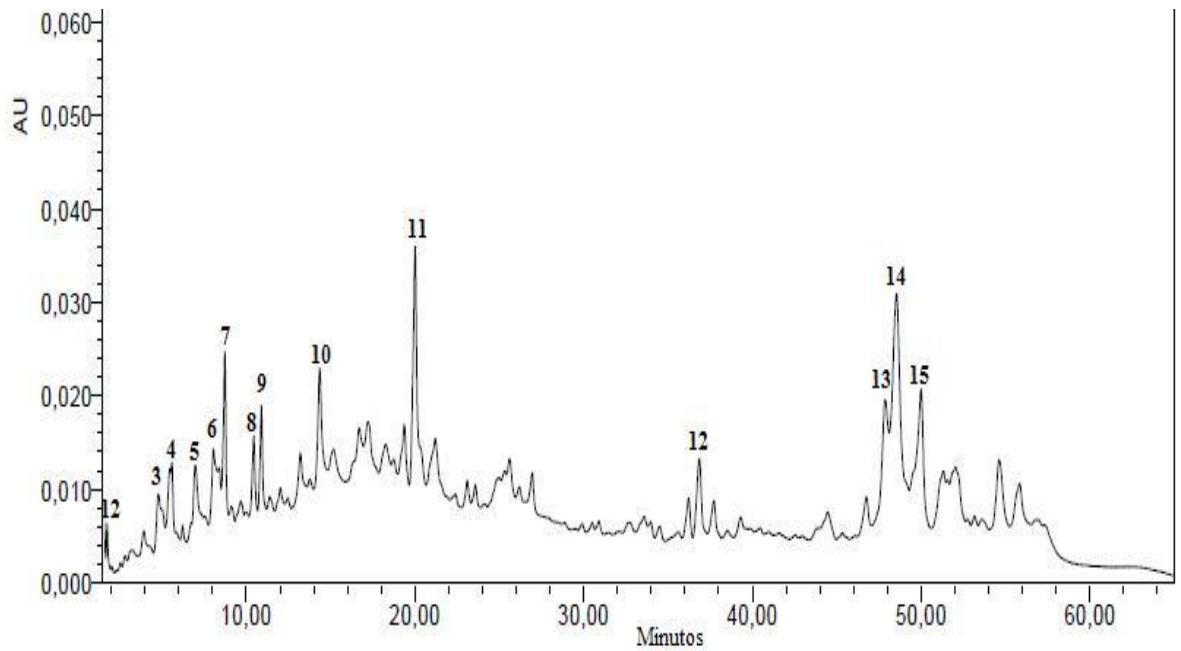


**Figura 34 c)** Espectros de UV das substâncias majoritárias do resíduo do liofilizado após as partições (REEAA).

O sistema eluente não foi efetivo para aumentar a resolução da fração em clorofórmio (FCA), mas ainda assim permitiu que se fizesse a análise dos possíveis constituintes presentes nesta fração. A fração em clorofórmio é rica em constituintes de baixa a média polaridade que aparecem no cromatograma após 30 min e ainda substâncias fenólicas possivelmente isoflavonas (7, 8, 10 e 11) de variados tempos de retenção. Além dessas substâncias estão

presentes outras substâncias fenólicas (1,3, 4, 5, 6). E substâncias de menor polaridade como 12, 13, 14 e 15 com tempos de retenção maiores de 30 min.

O cromatograma da FCA é apresentado na Figura 35 e os espectros das substâncias fenólicas na Figura 36 a e b.



**Figura 35:** Cromatograma da fração em clorofórmio (FCA).

Espectros de UV e Tempos de Retenção das substâncias da fração em clorofórmio do extrato hidroalcoólico de *A. nítida*

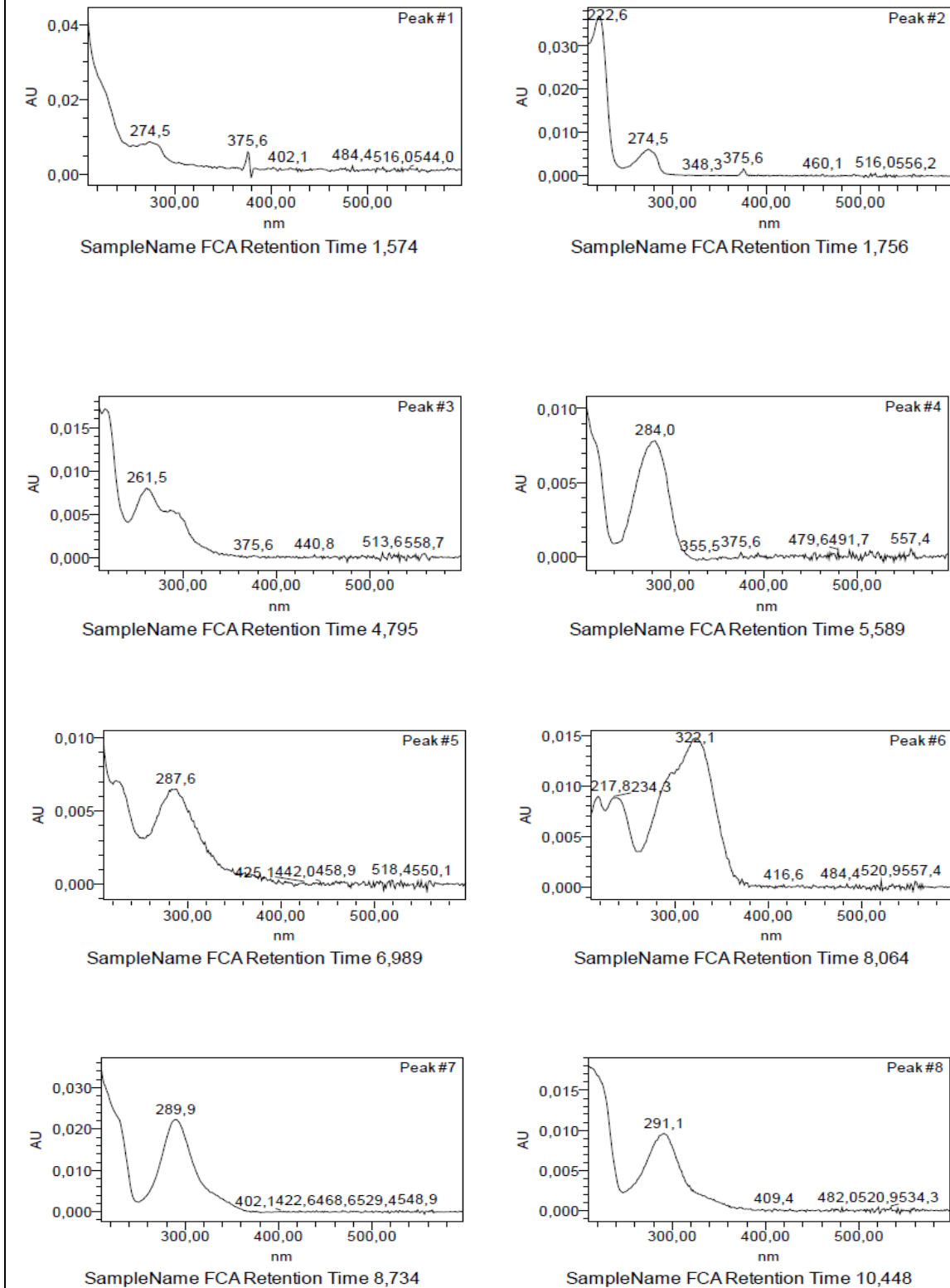


Figura 36 a) Espectros UV das substâncias fenólicas da fração em clorofórmio (FCA).

Espectros de UV e Tempos de Retenção das substâncias da fração em clorofórmio do extrato hidroalcoólico de *A. nítida*

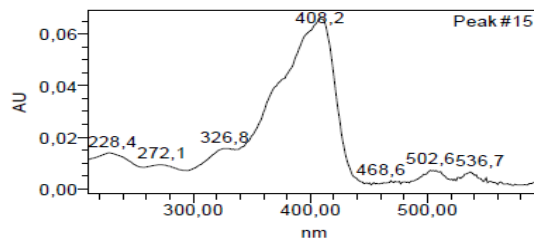
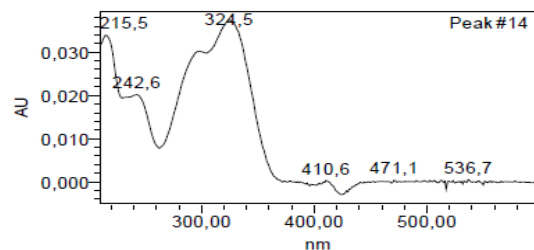
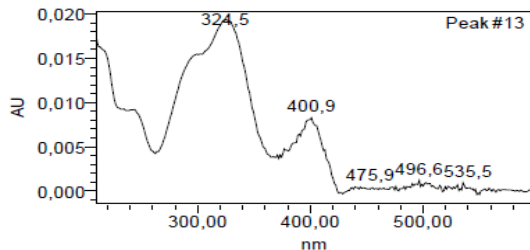
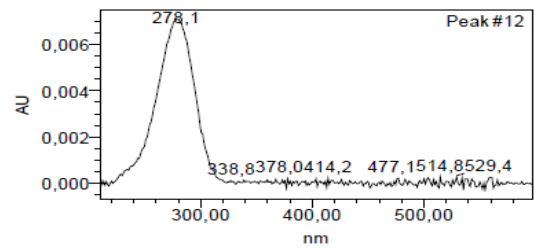
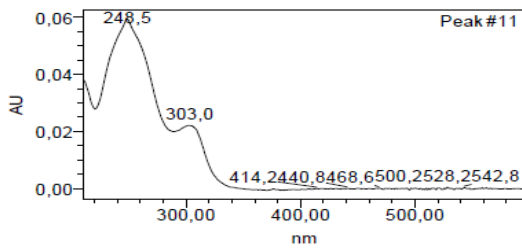
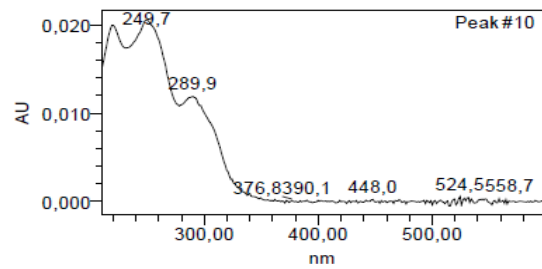
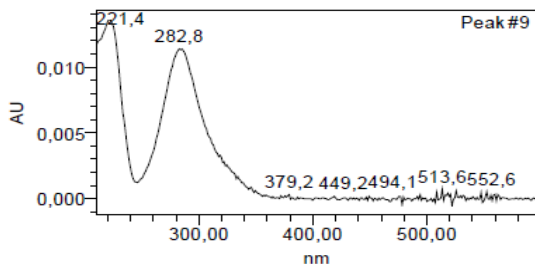


Figura 36 b) Espectros UV das substâncias fenólicas da fração em clorofórmio (FCA).



Os flavonoides dos diversos tipos estruturais e especialmente as isoflavonas (agliconas e glicosídeos) são constituintes característicos dos membros da subfamília Papilionoideae da família Fabaceae (CAGNIN & GOTTLIEB, 1978). Portanto, os resultados do presente estudo estão de acordo com o perfil químico apresentado pelo gênero *Andira* e a subfamília Papilionoideae.

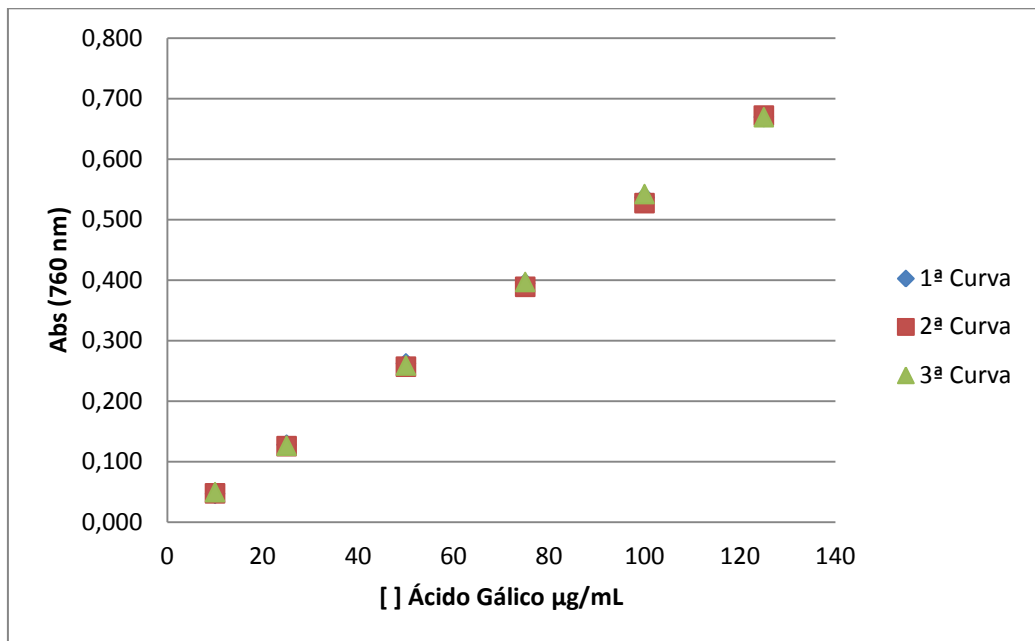
### **Determinação de conteúdo de derivados fenólicos totais**

A determinação espectrofotométrica de derivados fenólicos de uma amostra é realizado por meio de diversas técnicas, todavia, a que utiliza o reagente de Folin-Ciocalteu está entre as mais extensivamente utilizadas (BONOLI et al., 2004; ROGINSKY & LISSI, 2005). O reagente consiste de mistura dos ácidos fosfomolibídico e fosfotungstístico, no qual o molibdênio e o tungstênio encontram-se no estado de oxidação  $6^+$ , porém em presença substâncias redutoras, como os derivados fenólicos, a média do estado de oxidação dos metais passa para entre 5 e 6 e cuja coloração azul adquirida permite a determinação da concentração das substâncias redutoras, que não necessariamente precisam ter natureza fenólica (IKAWA et al., 2003; NACZK & SHAHIDI, 2004).

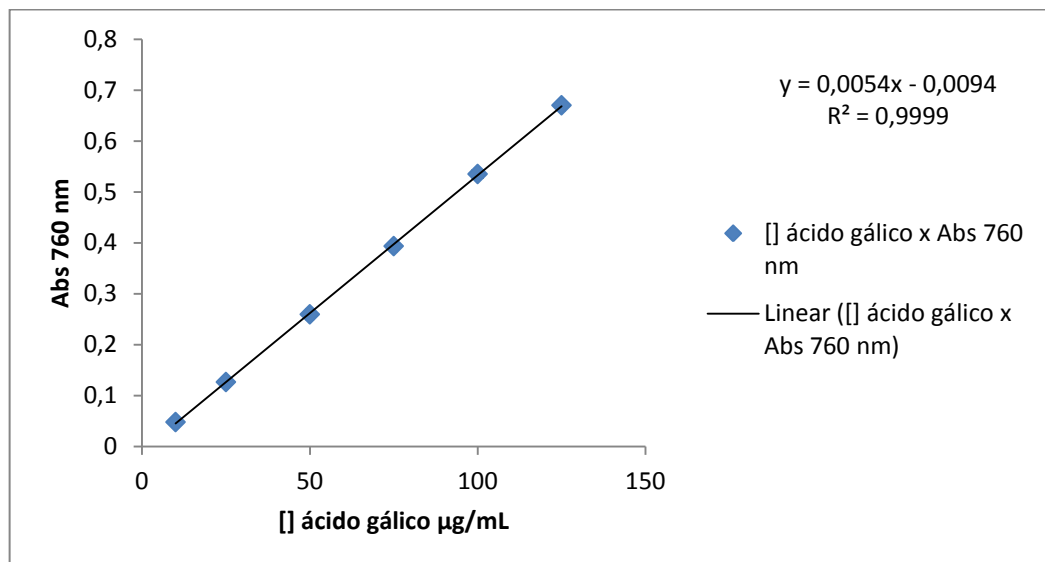
A quantificação foi realizada pelo método de Folin-Ciocalteu conforme descrito em Material e Métodos pág. 50. Para expressar os resultados obtidos na quantificação dos derivados fenólicos do extrato bruto hidroalcoólico e suas frações em equivalente em ácido gálico (g EAG/g amostra) e em equivalente em catequina (g EC/g amostra) foram construídas curvas analíticas dos padrões, ácido gálico e catequina. Para as três curvas analíticas de ácido gálico constataram-se que as inclinações e os interceptos das três retas eram equivalentes ( $p > 0,05$ ) e, portanto, a equação da reta foi estabelecida com os valores médios resultando em:  $y = 0,00542291x - 0,00935924$  ( $R^2 = 0,9999$ ). A sobreposição das curvas de calibração referentes aos três ensaios com ácido gálico nas concentrações de 10 a 125  $\mu\text{g/mL}$  estão demonstradas no Gráfico 1 e a curva analítica obtida pela média dos resultados pode ser vista no Gráfico 2.

De mesmo modo, foram construídas as curvas analíticas para a catequina (10 a 180  $\mu\text{g/mL}$ ), as quais por análise de covariância foi constatada a equivalência ( $p < 0,05$ ) das inclinações e dos interceptos das três retas e, portanto, a equação da reta foi estabelecida com os valores médios resultando em:  $y = 0,0039812x + 0,0231946$  ( $R^2 = 0,9979$ ). A sobreposição

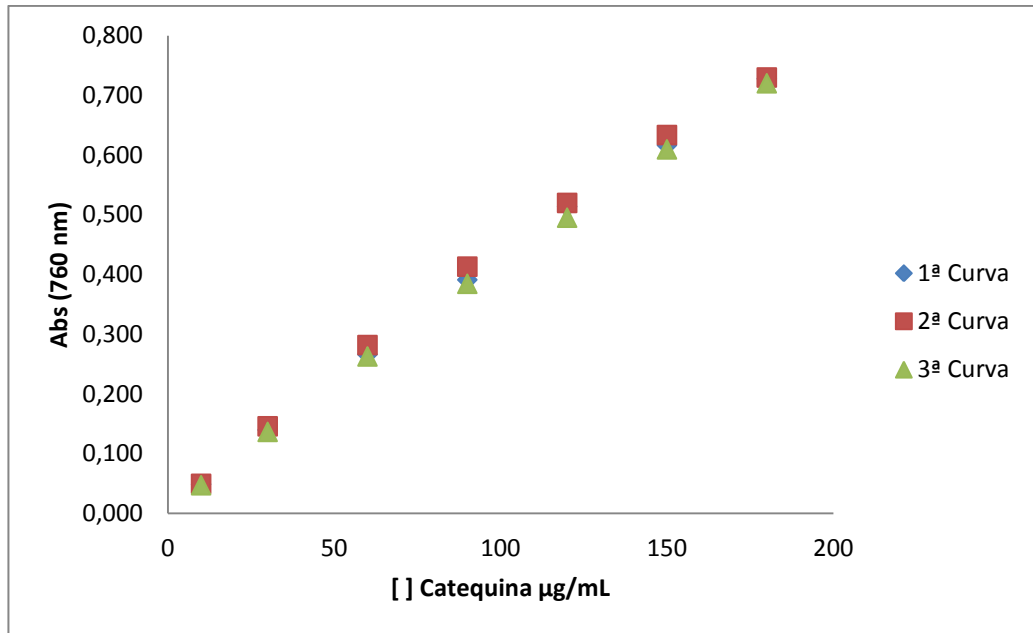
das curvas analíticas de catequina pode ser verificada no Gráfico 3 e a curva resultante obtida pela média dos resultados pode ser vista no Gráfico 4.



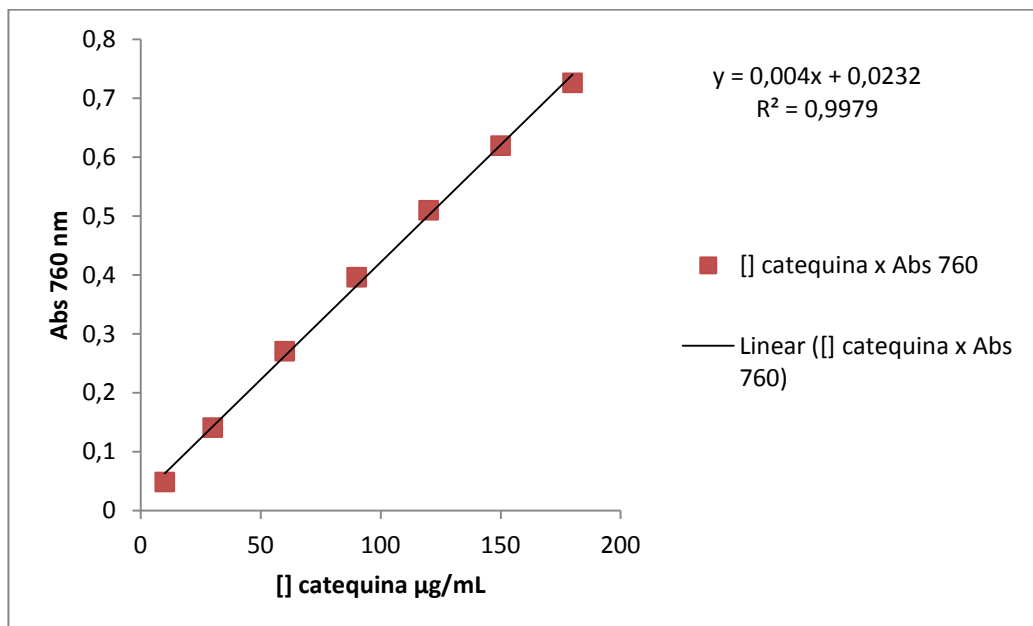
**Gráfico 1:** Curvas analíticas sobrepostas de ácido gálico, obtidas para a quantificação de derivados fenólicos totais por espectrofotometria no ultravioleta-visível em  $\lambda$  760 nm.



**Gráfico 2:** Curva analítica de ácido gálico equivalente aos três dias de ensaio. Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão. A equação da reta e o  $R^2$  se referem a média das três curvas



**Gráfico 3:** Curvas de analítica sobrepostas de catequina, obtidas para a quantificação de derivados fenólicos totais por espectrofotometria no ultravioleta-visível em  $\lambda$  760 nm.



**Gráfico 4:** Curva analítica de catequina equivalente aos três dias de ensaio. Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão. A equação da reta e o  $R^2$  se referem à média das três curvas.

Na quantificação dos derivados fenólicos o maior teor destas substâncias foi encontrado no EEAA (280 mg EAG/g amostra; 360 mg EC/g amostra), seguido pela FBA (250 mg EAC/g amostra; 320 mg EC/g amostra) e REEAA (250 mg EAC/g amostra; 320 mg EC/g amostra), os quais são estatisticamente iguais pelo Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ), em seguida

a FAEA (210 mg EAG/g amostra; 270 mg EC/g amostra) e pela FCA (90 mg EAG/g amostra; 100 mg EC/g amostra) (Tabela 4), a menos concentrada de derivados fenólicos.

Como já era esperado as frações mais polares e o extrato bruto foram aqueles onde se verificou o maior teor de derivados fenólicos. Por suas características químicas, a FCA apresenta menor teor de derivados fenólicos, uma vez que, nela são encontradas substâncias de baixa a média polaridade, contudo o conteúdo fenólico dessa fração provavelmente é formado por isoflavonas, as quais foram isoladas em muitos trabalhos de frações em clorofórmio.

**Tabela 4:** Doseamento de derivados fenólicos expressos em equivalente em ácido gálico e em catequina.

Amostra	Concentração média de Ácido Gálico $\mu\text{g/mL} \pm \text{DP}$	Concentração em mg EAG/g amostra	Concentração média de Catequina $\mu\text{g/mL} \pm \text{DP}$	Concentração em mg EC/g amostra
EEAA	<b>110,4006 <math>\pm</math> 3,34</b>	<b>280,0</b>	<b>142,2030 <math>\pm</math> 3,34</b>	<b>360,0</b>
FCA	<b>35,1643 <math>\pm</math> 2,56</b>	<b>90,0</b>	<b>39,7214 <math>\pm</math> 2,56</b>	<b>100,0</b>
FAEA	<b>84,1539 <math>\pm</math> 2,29</b>	<b>210,0</b>	<b>106,4517 <math>\pm</math> 2,29</b>	<b>270,0</b>
FBA	<b>99,5823 <math>\pm</math> 1,06<sup>A</sup></b>	<b>250,0</b>	<b>127,4671 <math>\pm</math> 1,06<sup>a</sup></b>	<b>320,0</b>
REEAA	<b>99,0291 <math>\pm</math> 1,72<sup>A</sup></b>	<b>250,0</b>	<b>126,7136 <math>\pm</math> 1,72<sup>a</sup></b>	<b>320,0</b>

EAC: equivalente em ácido gálico; EC: equivalente em catequina; DP: desvio padrão. Letras iguais indicam médias iguais – Teste de Tukey  $p < 0,05$ .

Miliauskas, Venskutonis & van Beek (2004) realizaram a avaliação da concentração de fenóis totais em mg/g extrato em equivalente de ácido gálico (EAG) de diversas espécies vegetais de variadas famílias botânicas: *Salvia officinalis* 22,6  $\pm$  0,9, *Salvia sclarea* 24,0  $\pm$  1,1, *Salvia glutinosa* 17,1  $\pm$  0,6, *Salvia pratensis* 9,7  $\pm$  0,4, *Lavandula angustifolia* 5,4  $\pm$  0,2, *Calendula officinalis* 6,6  $\pm$  0,3, *Matricaria recutita* 7,5  $\pm$  0,1, *Echinacea purpurea* 4,1  $\pm$  1,2, *Rhaponticum carthamoides* 13,3  $\pm$  0,3, *Juglans regia* 11,5  $\pm$  1,0, *Melilotus officinalis* 4,3  $\pm$  0,6, *Geranium macrorrhizum* 25,9  $\pm$  0,2, *Potentilla fruticosa* 37,9  $\pm$  2,1. Todas essas espécies apresentam conteúdo fenólico reduzido quando comparadas com o extrato e frações de *A. nitida* que apresentam conteúdo fenólico variando de 90-280 mg/g EAG, logo *A. nitida* pode

ser considerada promissora na busca por substâncias fenólicas, inclusive flavonoides. Além da avaliação das possíveis atividades biológicas, uma vez que os derivados fenólicos apresentam diversas possibilidades como agentes anti-inflamatórios, anticancerígenos, antimicrobianos, dentre outras.

### **Quantificação de derivados flavonoídicos**

Os polifenóis constituem um dos mais numerosos grupos de metabólitos secundários com mais de 8000 estruturas conhecidas. Eles podem ser moléculas simples (ácidos fenólicos, fenilpropanoides, flavonoides) ou substâncias altamente polimerizadas (ligninas, melaninas, taninos), com os flavonoides representando o mais comum e amplamente distribuído subgrupo (SOOBRAATTEE et al., 2005).

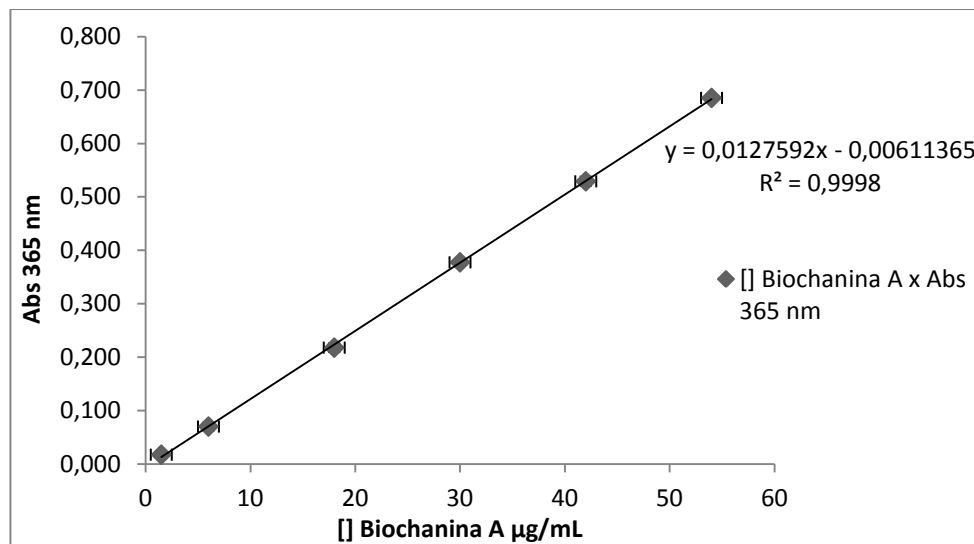
Os flavonoides possuem pronunciada atividade antioxidante, funcionando como neutralizante de radicais livres que são responsáveis pelo aparecimento de diversas patologias, como diabetes, arteriosclerose e câncer. Portanto, essas substâncias fenólicas desempenham um papel protetor para o organismo humano e seu consumo regular acarreta benefícios para o corpo (DORNAS et al., 2007).

O conteúdo flavonoídico do extrato hidroalcoólico de *A. nitida* e das suas frações semipurificadas foi realizado por complexação com cloreto de alumínio como descrito em Material e Métodos pág. 51. A determinação do total de flavonoides foi expressa em equivalente de quercetina (EQ), onde utilizou-se o comprimento de onda de 415 nm para a quantificação, o qual é justificado pelo estudo de Chang e colaboradores (2002) no qual após a avaliação de flavonoides de diversos grupos estruturais, constataram que esse comprimento de onda era mais adequado para a determinação do conteúdo flavonoídico. Como o comprimento de onda de 415 nm não reflete de maneira adequada o conteúdo de isoflavonas, já que a absorvância destas a 415 nm é demasiadamente baixa para contribuir de forma significativa para a absorvância total. Assim, o conteúdo flavonoídico foi expresso também em equivalente de Biochanina A (EB), sendo as leituras de absorvância feitas em  $\lambda$  365 nm. A expressão em EB também é justificada devido à química do gênero *Andira* por apresentar as isoflavonas como possíveis marcadores quimiossistemáticos (GARCEZ et al., 2010) e devido à análise do perfil químico por CLAE realizado no presente estudo, no qual sugere a presença dessas substâncias.

Petry e colaboradores (2001) tentaram estabelecer as condições ótimas para a reação de complexação de sete flavonoides em função das variáveis tempo de reação e concentração

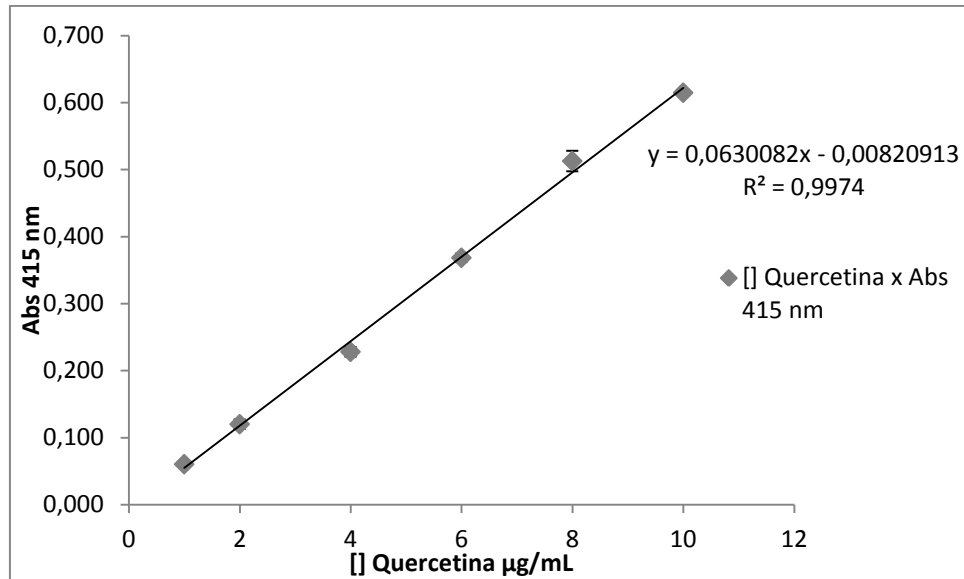
de  $\text{AlCl}_3$ . Os resultados evidenciaram uma reação com características particulares para cada flavonoide, não sendo possível estabelecer um padrão único de comportamento geral, tornando evidente a necessidade de avaliação caso a caso. Este fator poderia explicar, em parte, a obtenção de teores subestimados na quantificação espectrofotométrica de flavonoides totais por UV empregando-se a complexação com  $\text{AlCl}_3$ .

A análise de covariância indicou que as inclinações e os interceptos das três retas de biochanina A, obtidas por regressão linear, eram equivalentes e, portanto, a equação da reta foi estabelecida com os valores médios, resultando na equação  $y = 0,0127592x - 0,00611365$ ,  $R^2 = 0,9998$  (Gráfico 5).



**Gráfico 5:** Curva analítica de biochanina A equivalente aos três dias de ensaio. Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão. A equação da reta e o  $R^2$  se referem a média das três curvas

A análise de covariância indicou que as inclinações e os interceptos das três retas, obtidas por regressão linear, de quercetina em  $\lambda$  415 nm eram equivalentes e, portanto, a equação da reta foi estabelecida com os valores médios, resultando na equação  $y = 0,063082 - 0,00820913x$ ,  $R^2 = 0,9974$  (Gráfico 6).



**Gráfico 6:** Curva analítica de quercetina equivalente aos três dias de ensaio. Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão. A equação da reta e o  $R^2$  se referem a média das três curvas

Os valores do conteúdo de derivados flavonoídicos variou de 6,24 – 11,15 mg EB/ g amostra. No qual a FAEA apresentou o maior teor com 11,15 mg EB/g amostra e o menor na FBA com 6,24 mg EB/ g amostra. Estatisticamente, o EEAA e o REEA foram equivalentes, de mesma foram a FCA e a FBA pela análise de ANOVA seguida pelo Teste de Tukey  $p < 0,05$ .

Já na expressão por equivalente em quercetina (EQ) os valores variam de 1,20 – 4,55 mg EQ/g amostra. Onde, o teor encontrado em FAEA e em FBA foi estatisticamente igual. Os dados relativos ao doseamento de flavonoides encontram-se sumarizados na Tabela 5.

Nota-se que a quantificação em EB foi valiosa na expressão do conteúdo flavonoídico que poderia ser subestimado caso fosse somente realizado em EQ. Os resultados obtidos corroboram com a caracterização química realizada no presente estudo, a qual sugere a presença dessas substâncias flavonoídicas, além de outros tipos estruturais de flavonoides. Logo, a quantificação realizada em 415 nm por quercetina também é válida, uma vez que quantifica essas outras classes de flavonoides como as flavonas.

**Tabela 5:** Quantificação de derivados flavonoídicos expressos como média mais desvio padrão obtida pelas três determinações.

Amostra	[] Média de Biochanina A μg/mL ± DP	[] Média de Quercetina μg/mL ± DP	[] mg EB/g	Teor (%)	[] mg EQ/g	Teor (%)
				Isoflavonoides		Flavonoides
EEAA	<b>4,4240 ± 0,2394<sup>a</sup></b>	<b>2,0440 ± 0,0692</b>	<b>8,85</b>	<b>0,885</b>	<b>4,09</b>	<b>0,409</b>
FCA	<b>3,4835 ± 0,0905<sup>b</sup></b>	<b>0,5998 ± 0,0572</b>	<b>6,97</b>	<b>0,697</b>	<b>1,20</b>	<b>0,120</b>
FAEA	<b>5,5735 ± 0,4895</b>	<b>2,1763 ± 0,0485<sup>A</sup></b>	<b>11,15</b>	<b>1,11</b>	<b>4,35</b>	<b>0,435</b>
FBA	<b>3,1178 ± 0,2519<sup>b</sup></b>	<b>2,2768 ± 0,0183<sup>A</sup></b>	<b>6,24</b>	<b>0,624</b>	<b>4,55</b>	<b>0,455</b>
REEAA	<b>4,3456 ± 0,1632<sup>a</sup></b>	<b>1,8483 ± 0,0183</b>	<b>8,69</b>	<b>0,869</b>	<b>3,70</b>	<b>0,370</b>

EB: equivalente em biochanina A; EQ: equivalente em quercetina. Letras iguais indicam médias iguais de acordo com ANOVA/Teste de Tukey  $p < 0,05$

As propriedades antioxidantes das isoflavonas podem contribuir para seus efeitos biológicos. Os mecanismos antioxidantes incluem sua habilidade de neutralizar espécies reativas de oxigênio e quelante de metais. Além disso, aumentam a atividade de enzimas como a superóxido dismutase, catalase e glutatona peroxidase (WEI et al., 1995).

Outra propriedade biológica importante das isoflavonas é a capacidade de ligação com receptores de estrogênio como o ER $\beta$ . Apesar da fraca atividade estrogênica comparada ao  $\beta$ -estradiol, sua importância não pode ser ignorada, visto que os níveis de isoflavonas circulantes no plasma podem exceder facilmente a concentração de  $\beta$ -estradiol com uma alimentação a base de alimentos de soja (RIMBACH et al., 2008).

Além das ações biológicas citadas as isoflavonas ainda apresentam atividade antiviral (ANDRES et al., 2009), anti-tumoral (SHU et al., 2001), antiosteoporose, antidiabética, além de diminuir a incidência de doenças cardiovasculares (ESTEVES & MONTEIRO, 2001).

A soja é a principal fonte dietética de isoflavonas, sendo que 1g contém 1mg dessas substâncias flavonoídicas (FERRARI & TORRES, 2002). Tanto o extrato quanto as frações de *A. nitida*, mostraram-se ricos em isoflavonas com a média variando de 6,24-11,15 mg EB/



g amostra. Logo, configuram possíveis fontes de isoflavonas, as quais podem ter um amplo espectro de ações biológicas ainda não estudadas para este gênero.

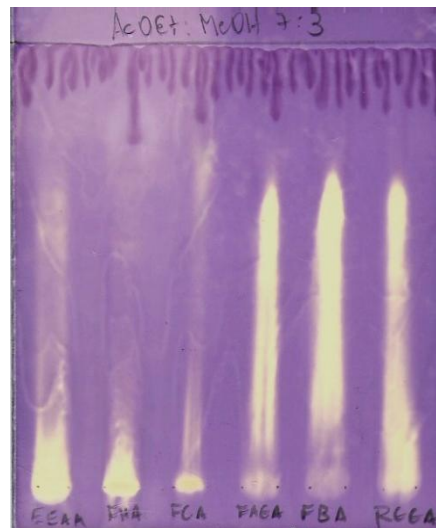
## **5.2. Atividades Biológicas da espécie vegetal *Andira nitida***

### **5.2.1. Potencial antioxidante**

Após o estabelecimento do perfil químico do extrato e frações de *A. nitida*, foi constatada a presença de flavonoides, possivelmente, isoflavonas e catequinas oligoméricas. Os flavonoides são substâncias dotadas de capacidade antioxidante, uma vez que a estrutura química propicia tal ação pela presença de hidroxilas fenólicas e devido ao radical flavonoila ser estabilizado por deslocalização de carga pelo anel aromático. Dessa forma, optou-se por explorar o potencial antioxidante da espécie em questão, já que não existem dados científicos nas mais variadas plataformas de dados sobre a atividade antioxidante de espécies do gênero *Andira*. Sendo assim, confere-se caráter inédito e relevante ao estudo em questão. Além disso, foi verificada a possível correlação entre o potencial antioxidante e antimalárico, uma vez que a propriedade antioxidante desses derivados parece ser importante no tratamento da malária, já que o estresse oxidativo normalmente acompanha essa infecção (GRIFFITHIS et al. 2001).

### **Bioautografia com solução de DPPH 0,2% em metanol**

Após a verificação do perfil químico das amostras por CCD, tendo em vista a riqueza de derivados fenólicos das amostras, foi realizada a revelação com solução de DPPH 0,2% a fim de avaliar se as substâncias presentes no extrato hidroalcoólico e frações possuíam atividade antioxidante. A reação é positiva quando existem zonas amareladas contra um fundo arroxeado, o que significa que o radical DPPH foi reduzido por doação de elétrons pelas substâncias presentes nas amostras (BRAND-WILLIANS et al., 1995). Todas as amostras apresentaram positividade para a bioautografia com DPPH, indicando a presença de substâncias dotadas de atividade antioxidante (Figura 37).



Da esquerda para a direita na cromatoplaça foram aplicados: EEAA (Extrato hidroalcoólico), FHA: fração em hexano, FCA: fração em clorofórmio, FAEA: fração em acetato de etila, FBA: fração em butanol e REEA: resíduo obtido após as partições do liofilizado

**Figura 37:** Cromatograma revelado com solução a 0,2% de DPPH em metanol, eluído com AcOEt:MeOH 7:3, indicando a presença de substâncias com potencial antioxidante.

### **Avaliação da atividade antioxidante pelo ensaio espectrofotométrico de redução do radical 1,1-difenil-2-picrilidrazila (DPPH)**

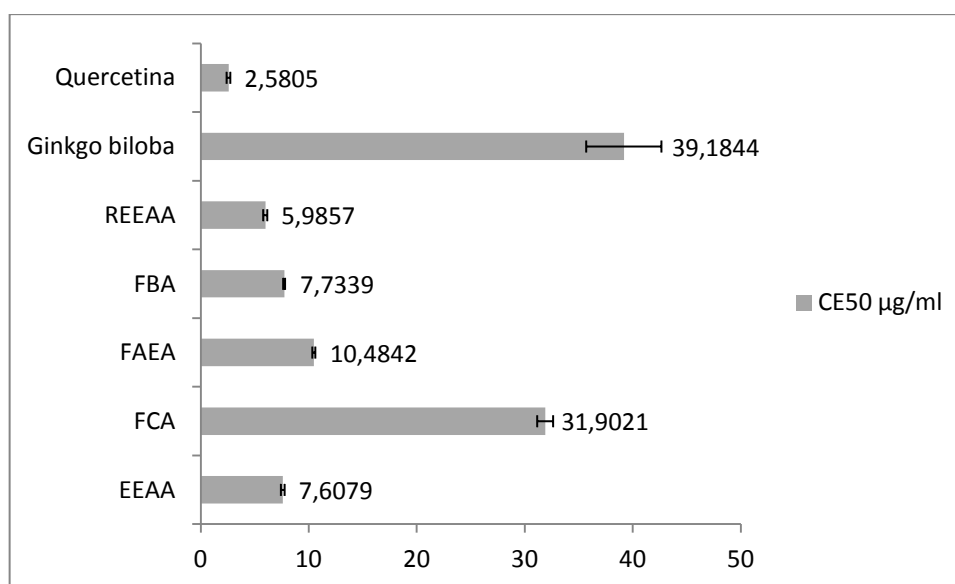
O método DPPH está baseado no descoramento de uma solução composta por radicais estáveis DPPH• de cor violeta. Quando esta solução é colocada frente a substâncias que podem ceder um átomo de hidrogênio, ocorre o descoramento (HUANG et al., 2005), logo se baseia na transferência de elétrons de um composto antioxidante para um oxidante. O método é simples, rápido e conveniente, sendo útil para a triagem de muitas amostras no intuito de avaliar a atividade neutralizante de radical livre (KOLEVA et al., 2001).

As CE<sub>50</sub> do extrato hidroalcoólico dos galhos de *A. nitida* e suas frações variaram de 5,9857 – 31,9021 µg/mL (Tabela 6, Gráfico 7). Valores de CE<sub>50</sub> menores do que 30 µg/mL indicam um boa atividade antioxidante (RAMOS et al., 2003), portanto é notável o bom potencial antioxidante do extrato e frações obtidas de *A. nitida*.

**Tabela 6:** CE<sub>50</sub> das amostras e padrões frente ao radical DPPH.

Amostra	CE <sub>50</sub> µg/mL ± DP
EEAA	7,6079 ± 0,1724 <sup>a</sup>
FCA	31,9021 ± 0,7367
FAEA	10,4842 ± 0,1386
FBA	7,7339 ± 0,0875 <sup>a</sup>
REEAA	5,9857 ± 0,1885
<i>Ginkgo biloba</i>	39,1844 ± 3,4822
Quercetina	2,5805 ± 0,1713

Os valores referentes à CE<sub>50</sub> são a média das três determinações mais o desvio padrão entre elas. Letras iguais indicam médias iguais – ANOVA/Teste de Tukey p<0,05.



**Gráfico 7:** Concentrações efetivas 50% (média de 3 determinações) com desvio padrão para o extrato hidroalcoólico dos galhos de *A. nitida* e suas frações e dos controles positivos (extrato padronizado de *Ginkgo biloba* e quercetina). EEAA: extrato hidroalcoólico dos galhos de *A. nitida*, FCA: fração em clorofórmio, FAEA: fração em acetato de etila, FBA: fração em butanol e REEAA: resíduo proveniente do liofilizado após as partições.

As amostras testadas apresentaram alta atividade antioxidante, sendo REEAA o mais efetivo em doar elétrons ao radical estável DPPH•. O maior potencial antioxidante foi encontrado para o REEAA (CE<sub>50</sub> = 5,9857 µg/mL), seguido pelas amostras estatisticamente

equivalentes pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) EEAA (7,6079  $\mu\text{g/mL}$ ) e FBA (7,7339  $\mu\text{g/mL}$ ), depois a FAEA (10,4842  $\mu\text{g/mL}$ ) e por fim a FCA (31,9021  $\mu\text{g/mL}$ ).

A análise dos resultados desse trabalho considera como valores de referência a  $CE_{50}$  do *Ginkgo biloba* (39,18  $\mu\text{g/mL}$ ) para comparar a atividade antioxidante das amostras testadas, uma vez que o *G. biloba* é uma das plantas consideradas com alta atividade antioxidante (MENSOR et al., 2001). Foi também utilizada como padrão a Quercetina (2,58  $\mu\text{g/mL}$ ).

Em relação ao extrato padronizado de *Ginkgo biloba*, a FCA teve atividade semelhante e todas as demais amostras testadas foram mais ativas do que ele, verificada pelo Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). O EEAA e a FBA foram 5 vezes mais ativos, a FAEA foi 3,7 vezes mais ativa, e o mais ativo neste teste foi o REEAA sendo cerca de 6 vezes mais ativo que o extrato de *Ginkgo biloba*. Já em relação à quercetina ( $CE_{50} = 2,58 \mu\text{g/mL}$ ), nenhuma amostra demonstrou atividade comparável.

Como foi verificado em CCD, CLAE e quantificação de derivados fenólicos e flavonoídicos, as amostras são muito ricas em derivados fenólicos, especialmente, flavonoides. Assim, as amostras mais polares apresentaram melhor atividade antioxidante, o que pode estar relacionado com o alto conteúdo de derivados fenólicos e flavonoídicos, uma vez que essas substâncias possuem química especial e propriedades redutoras que desempenham um papel importante na neutralização ou sequestro de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os intermediários formados pela ação de antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático presente na estrutura química destas substâncias (SOARES, 2002; CHUN et al., 2005)

A estrutura dos flavonoides é fator preponderante na atividade antioxidante que é dependente de substituintes no anel heterocíclico e no anel B. Mais especificamente, os maiores determinantes da capacidade de neutralizar os radicais livres são (i) a presença do grupo catecol no anel B, que tem a melhor propriedade doadora de elétrons e é um alvo dos radicais; e (ii) a ligação dupla 2,3- conjugada com o grupo 4-oxi, que é responsável pela deslocalização de elétrons (PIETTA, 2000). Portanto, os flavonoides reagem avidamente quando são colocados frente a radicais livres como o DPPH e o ABTS. Assim estes métodos de determinação de atividade antioxidante são comumente utilizados na avaliação de substâncias naturais.

O interesse na descoberta de antioxidantes naturais tem aumentado, no intuito de substituir aqueles sintéticos, os quais têm tido o uso restringido devido à toxicidade e até

mesmo carcinogênese. Os antioxidantes naturais como os polifenóis e flavonoides têm um potencial papel na prevenção de doenças como câncer, arteriosclerose, diabetes, entre outras. Muitas plantas medicinais têm sido pesquisadas e sua atividade antioxidante e de extinção de radicais livres reportadas (RAJBAPOOR, BURKAN & SENTHILKUMAR, 2010; RAJKUMAR & GUHA, 2010).

A espécie *A. nitida* ainda é carente de estudos científicos que demonstrem suas atividades biológicas, portanto, a determinação de sua atividade antioxidante constitui-se um trabalho inédito na literatura científica e valida o presente trabalho.

Kumar, Raj Kapoor & Perumal (2012) ao avaliarem a atividade antioxidante de *Indigofera cassioides* Rottl. Ex. DC. (Fabaceae) pelo método DPPH encontraram  $CE_{50}$   $13,97 \pm 0,80 \mu\text{g/mL}$  e  $387,0 \pm 24,17 \text{ mg}$  de equivalente de ácido gálico por grama na quantificação de derivados fenólicos totais para o extrato metanólico das folhas, uma atividade antioxidante pronunciada e bem próxima daquela obtida a partir do extrato hidroalcoólico e frações de *A. nitida*. Porém *Indigofera cassioides* Rottl. Ex. DC. apresenta um conteúdo fenólico maior. Talvez as substâncias encontradas em *A. nitida* sejam mais eficientes na neutralização do radical DPPH, uma vez que esta ação é realizada mediante a uma concentração menor de derivados fenólicos totais.

No estudo realizado por Gođevac e colaboradores (2008) ao avaliarem nove espécies da família Fabaceae, sendo estas: *Trifolium pannonicum*, *Oxytropis halleri*, *Oxytropis campestris* subsp. *Dinarica*, *Onobrychis scardica*, *Lathyrus binatus*, *Coronilla emerus*, *Astragalus glycyphyllos*, *Anthyllis vulneraria* e *Anthyllis áurea*, encontraram  $CE_{50}$  que variou de 13,19 a 156,98  $\mu\text{g/mL}$  para o ensaio DPPH e de 38,0 a 180,88 mg EAG/g extrato seco para ensaio de quantificação de derivados fenólicos totais. As plantas que apresentaram maior atividade antioxidante foram aquelas mais ricas em derivados fenólicos, sendo estas, *Trifolium pannonicum* ( $106,81 \pm 2,38 \text{ mg EAG/g extrato seco} - 13,19 \pm 0,90 \mu\text{g/mL}$ ), *Lathyrus binatus* ( $180,88 \pm 5,61 \text{ mg EAG/g extrato seco} - 19,62 \pm 1,65 \mu\text{g/mL}$ ) e *Anthyllis áurea* ( $108,96 \pm 3,14 \text{ mg EAG/g extrato seco} - 37,68 \pm 1,16 \mu\text{g/mL}$ ). Nota-se que a atividade antioxidante se mostra maior em plantas ricas em constituintes fenólicos e esta foi também encontrada na avaliação das amostras originadas dos galhos de *A. nitida*.

Já Bianco e Santos (2010) avaliaram a atividade antioxidante de *Bauhinia microstachya* (Raddi) J. F. Macbr (Fabaceae) pelo método DPPH. Os resultados obtidos demonstram a alta atividade antioxidante de duas frações FAEF (fração em AcOEt, folhas) e FAEC (fração em AcOEt, caules)  $CE_{50} = 2,75 \pm 0,11$  e  $2,86 \pm 0,004 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , respectivamente. Estas frações são dotadas de conteúdo flavonoídico significativo, sendo

assim estes resultados sugerem que eles possam estar envolvidos, pelo menos em parte, no mecanismo antioxidante desta espécie. O que pode ser estendido para a análise do grande atividade antioxidante de *A. nitida*, que pela literatura disponível e os resultados cromatográficos, mostra-se rica em flavonoides, especialmente isoflavonas.

Extratos brutos enriquecidos em derivados fenólicos foram obtidos por extração com acetona 70% acidificada com 1% HCl de *Bauhinia bowkeri*, *Bauhinia galpinii*, *Bauhinia petersiana* e *Bauhinia variegata* (Fabaceae), os quais apresentaram CE<sub>50</sub> de, respectivamente,  $14,50 \pm 0,50$ ,  $55,01 \pm 0,25$ ,  $17,19 \pm 0,14$ ,  $9,24 \pm 1,30$  µg/mL (AHMED et al., 2012). Estes resultados indicam alta atividade antioxidante das espécies de *Bauhinia* e os resultados são similares àqueles obtidos a partir do extrato hidroalcoólico de *A. nitida*. Isso só corrobora com o grande potencial antioxidante das espécies pertencentes à família Fabaceae, a qual se mostra promissora na busca de tais substâncias.

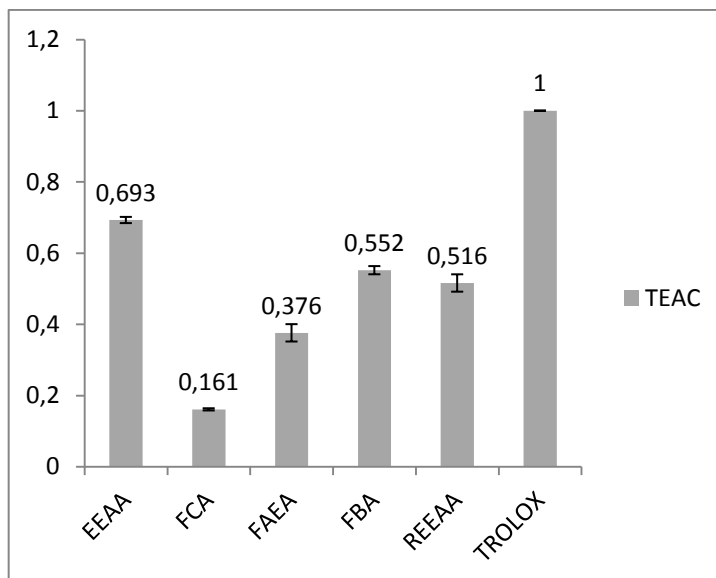
#### **Método colorimétrico de redução do ABTS<sup>•+</sup> (determinação da capacidade antioxidante equivalente ao trolox - TEAC)**

Atualmente o método ABTS tem sido amplamente utilizado tanto para amostras biológicas, quanto substâncias puras/isoladas ou extratos de plantas de natureza hidrofílica ou lipofílica. O composto cromógeno 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico) (ABTS) apresenta cor azul/verde com máximo de absorção a 342nm, sendo muito solúvel em água e quimicamente estável. O radical ABTS<sup>•+</sup>, uma vez gerado por meio de enzimas (peroxidase, mioglobina) ou quimicamente (dióxido de magnésio, persulfato de sódio ou ABAP [2,2'-azobis-(2- amidinopropeno) HCl], passa a apresentar novas características com máximos de absorção a 414, 645, 734 e 815 nm. O radical ABTS<sup>•+</sup> é mais indicado para ensaios de substâncias coloridas, reduzindo a possibilidade de interferência dessas substâncias que absorvem na região do visível ou compostos resultantes de reação secundária. O ensaio desenvolvido por Re e colaboradores (1999) foi validado por sua estabilidade, reprodutibilidade e por ser uma alternativa economicamente viável (KUSKOSKI et al., 2004).

O ensaio foi realizado como descrito em Material e Métodos pág. 56, utilizando-se o  $\lambda$  734 nm, a fim de serem evitadas interferências e diferentemente do método DPPH, os resultados foram obtidos através da cinética de reação de redução do radical ABTS<sup>•+</sup>. Dessa forma, é possível avaliar de melhor forma a eficiência da neutralização do radical livre e correlacionar o potencial antioxidante das amostras e do controle positivo, o Trolox.

Os valores TEAC (atividade antioxidante equivalente ao Trolox) para o extrato hidroalcoólico (EEAA) dos galhos de *A. nitida* e suas frações semipurificadas foram de 0,161-0,698 (Gráfico 8). A amostra menos ativa foi a fração em clorofórmio ( $0,161 \pm 0,0031$ ), fato esperado pelo baixo teor de derivados fenólicos. A amostra mais ativa foi o extrato hidroalcoólico ( $0,693 \pm 0,0087$ ), que apresentou maior teor de derivados fenólicos pelo método de Folin-Ciocalteu. A fração em butanol e o resíduo obtido após as partições foram bastante similares com valor de TEAC de  $0,552 (\pm 0,0115)$  e  $0,516 (\pm 0,0244)$ , respectivamente. Estas amostras apresentaram conteúdo de derivados fenólicos estatisticamente equivalente pelo Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ), o que justifica a similaridade no presente ensaio. A fração em acetato de etila apresentou um valor mediano ( $0,376 \pm 0,0143$ ) comparado às outras amostras, o que também é compatível com o teor de derivados fenólicos desta fração.

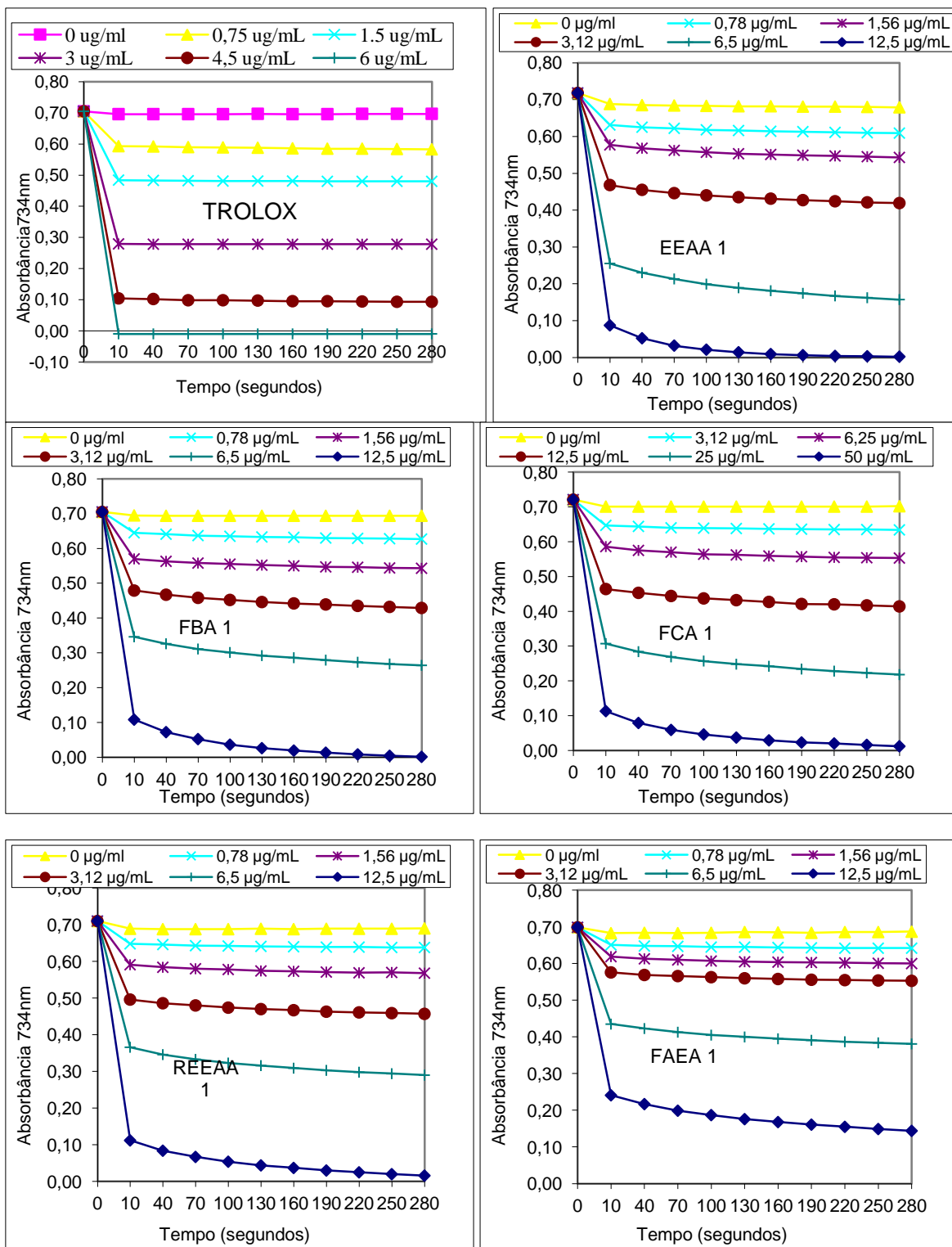
Percebe-se que os extratos e frações possuem, de uma forma geral, pronunciada ação antioxidante e a análise cinética do decaimento da absorvância é rápido nos 10 primeiros segundos perdurando até 30 segundos de teste, depois tendendo a ficar constante até os cinco minutos finais (Figura 38). Isso demonstra que o extrato hidroalcoólico e suas frações possuem metabolitos antioxidantes de ação rápida, característica importante para um bom extrato antioxidante, uma vez que, *in vivo*, espécies reativas como o radical hidroxila tem meia-vida curta, sendo necessárias substâncias de ação imediata para sua neutralização (BARREIROS et al., 2006). Além disso, as amostras apresentaram comportamento cinético semelhante ao Trolox, um antioxidante análogo da vitamina E, evidenciando um possível mecanismo de ação das amostras.



**Gráfico 8:** Valores de TEAC obtidos das três determinações mais o desvio padrão das amostras obtidos no ensaio de redução do radical  $ABTS^{\cdot+}$ . EEAA: extrato hidroalcoólico dos galhos de *A. nitida*, FCA: fração em clorofórmio, FAEA: fração em acetato de etila, FBA: fração em butanol e REEAA: resíduo proveniente do liofilizado após as partições.

As amostras demonstraram uma rápida etapa inicial de neutralização do radical  $ABTS$  e uma fase secundária mais lenta. Isto pode indicar a presença de substâncias que apresentam em sua estrutura um grupo catecol (substituintes *orto* diidroxila) ou pirogalol (substituintes triidroxila). Estes grupos no anel B da estrutura dos flavonoides estão entre os principais fatores estruturais para a atividade antioxidante, já que é um local de favorável potencial de redução (PANNALA et al., 2001). Estas informações corroboram com a química das possíveis substâncias presentes nas amostras pelo estabelecimento do perfil químico por CLAE.





**Figura 38:** Curvas cinéticas do controle positivo (Trolox) e as amostras provenientes de *A. nitida*.

A partir do conhecimento da química do gênero *Andira*, no qual se destacam as isoflavonas e com base no perfil químico estabelecido neste trabalho, o qual sugere a presença de isoflavonas e derivados de catequina, pode-se atribuir, em parte, a atividade antioxidante

das amostras a esses metabólitos. As isoflavonas apresentam altos valores de TEAC descritos na literatura como a genisteína 2,90, a biochanina A 1,16, a daidzeína 1,25 e a genisteína 7-glicosídeo 1,24. Apesar da localização do anel aromático em C-3, onde em outras subclasses observa-se a presença de 3-OH que contribui para o aumento da atividade antirradicalar, nota-se que o grupo hidroxila em C-4' e a presença de OH nos carbonos 5 e 7 no anel A são requisitos estruturais relevantes para a atividade neutralizante de radicais livres das isoflavonas (PIETTA, 2000). De acordo com Miyase e colaboradores (1999a e 1999b) as isoflavonas são frequentemente mais ativas do que, por exemplo, as flavonas, devido o efeito da proximidade do grupo –OH em C-5 e –C=O em C-4 nos isoflavonoides.

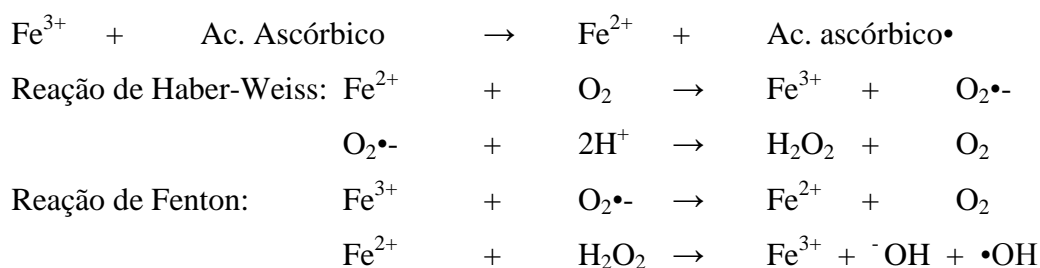
Tang e colaboradores (2004) realizaram a avaliação da atividade antioxidante de diversas plantas chinesas obtendo os seguintes valores de TEAC: *Cratoxylum cochinchinense* (folhas) 1,55; *Curculigo orchoides* Gaertn (rizoma) 0,22; *Cortex magnoliae officinalis* (galhos) 0,36; *Psoralea corylifolia* L (fruto) 0,23. *Glycyrrhiza uralensis* Fisch (galhos) 0,09. Nota-se que apenas *Cratoxylum cochinchinense* foi superior ao trolox e os demais extratos tiveram atividades discretas. O extrato dos galhos de *A. nitida* foi mais ativo que a maior parte dessas espécies com valor de TEAC de 0,693, que pode ser justificado em parte pelo grande conteúdo de derivados fenólicos.

### **Quantificação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico formadas na peroxidação de lipossomos**

A peroxidação lipídica é causada pelo ataque de uma espécie reativa (geralmente •OH), que abstrai um átomo de hidrogênio (H•) de um grupo metileno alílico, normalmente, de um ácido graxo poliinsaturado, deixando um elétron desemparelhado no carbono, caracterizando a etapa de iniciação. Este radical é usualmente estabilizado por rearranjo molecular, formando um dieno conjugado. Sob condições aeróbicas, o carbono radicalar do dieno conjugado reage com O<sub>2</sub> (que é uma molécula hidrofóbica e, portanto, se concentra no interior das membranas) e forma o radical peroxila. Este radical peroxila é capaz de abstrair H• de moléculas de lipídeos adjacentes, cujo carbono radicalar sofre novo rearranjo, reage com O<sub>2</sub> e forma outro radical peroxila e assim sucessivamente, caracterizando a reação em cadeia da etapa de propagação. O radical peroxila combina-se com o H• abstraído, gerando o lipídeo hidroperóxido (LOOH) que ao sofrer quebra, forma aldeídos como malonaldeído e 4-hidroxinonenaldeído, entre outros (VASCONCELOS et al., 2007).

O aldeído malôndico (MDA) é uma substância secundária da peroxidação lipídica, derivado da cisão beta dos ácidos graxos poliinsaturados peroxidados, tais como ácido linoleico, araquidônico e docosaexanoico. Atualmente, o MDA é considerado um candidato potencial para ser escolhido como um biomarcador geral de dano oxidativo em plasma (VASCONCELOS et al. 2007). No método aqui proposto, foi avaliada a capacidade das amostras em inibir a formação de MDA, e outros aldeídos secundários, gerados a partir da peroxidação de fosfolípídeos de cérebro bovino na forma de lipossomos, induzida pelo sistema Fe (III)/ascorbato. A quantificação de malondialdeído gerado é feita pela reação com o ácido tiobarbitúrico em meio ácido, à quente, formando um cromógeno que pode ser quantificado por espectrofotometria em  $\lambda$  532 nm.

Para tentar mimetizar o que acontece *in vivo*, foi proposta a realização do presente ensaio, descrito em Material e Métodos pág. 57, no qual o meio reacional é lipofílico e por isso, as amostras menos polares foram selecionadas (fração em hexano e em clorofórmio). Estas amostras podem não apresentar boa atividade antioxidante, por questões de solubilidade, frente a outros métodos realizados em meio hidrofílico, como o DPPH e o TEAC. Nesse ensaio, a peroxidação lipídica foi induzida pela reação do ácido ascórbico com Fe (III), um metal de transição, e nestas condições o ác. Ascórbico apresenta propriedades pro-oxidantes, reduzindo o Fe (III) a Fe (II) e este último reage com oxigênio molecular ( $O_2$ ), originando o ânion superóxido e uma sequência de reações que culmina com a formação do radical  $\bullet OH$ ;



As frações em hexano e em clorofórmio foram ativas neste sistema lipofílico, como já era esperado, com  $CE_{50}$   $\mu g/mL$  de 40,5 e 136,2  $\mu g/mL$ , respectivamente. Portanto, foram eficientes no impedimento da peroxidação lipídica realizada pela combinação do  $FeCl_3$  e o ácido ascórbico, sendo resultados promissores da busca de antioxidante de natureza lipofílica. A atividade dessas amostras pode ser justificada pela proteção do fosfolípídeos de membrana através do impedimento de formação das espécies reativas nas reações de Fenton e Haber-Weiss por quelação do Fe (II), ou até mesmo bloqueando sua oxidação a Fe (III), o que interfere na etapa de iniciação do processo oxidativo. Por outro lado, as amostras poderiam

atuar também na etapa de propagação pela abstração de radicais peroxila, o que diminui a propagação dos danos oxidativos aos lipossomos.

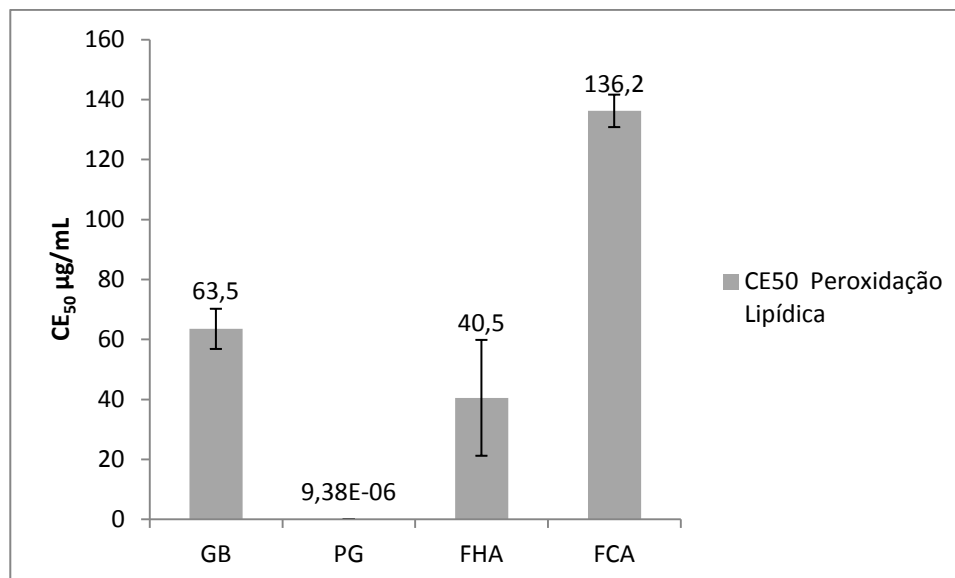
As atividades das amostras foram comparadas com aquelas do extrato comercial padronizado de *Ginkgo biloba* e propilgalato, os quais são reconhecidos pela capacidade antioxidante potente. O extrato de *Ginkgo biloba* apresentou  $CE_{50}$  de 63,5  $\mu\text{g/mL}$  e o propilgalato  $9,38 \times 10^{-6}$  M e ainda com a do  $\alpha$ -tocoferol cuja literatura reporta uma  $CE_{50}$  de 13,68 $\mu\text{g/mL}$  (RAVISHANKARA et al., 2002). Somente a FHA foi estatisticamente semelhante ao extrato de *Ginkgo biloba* pelo Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Em um trabalho com vários derivados de hidroxiflavonas, Cotelle e colaboradores (1996) mostraram que o sistema de substituição do tipo pirogalol, principalmente, mas também catecol no anel B está relacionado com melhor atividade protetora contra a peroxidação lipídica.

Miyase e colaboradores (1999a e 1999b) avaliaram a atividade antioxidante 15 novos derivados isoflavonoídicos isolados a partir de *Lespedeza homoloba*, Fabaceae, usando o modelo de inibição da peroxidação em homogenatos de cérebro de rato. Os autores concluíram que, além da proximidade dos grupos  $-\text{OH}$  em C-5 e  $-\text{C}=\text{O}$  em C-4 nas isoflavonas contribui para maior atividade antioxidante, aqueles derivados contendo grupo catecol tiveram maior atividade contra a peroxidação em homogenatos de cérebro de ratos e também melhor atividade de extinção de ânion superóxido. Além disso, não encontraram para os derivados isoflavonoídicos testados uma correlação clara entre as atividades inibidora da peroxidação do homogenato de cérebro de rato e a de quelação de Fe(II). Jiang e colaboradores (2005) compararam o efeito antioxidante de duas espécies de Fabaceae, *Pueraria thomsonii* e *P. lobata*, usando o modelo de oxidação lipídica e proteica das membranas de células vermelhas pelo diidrocloreto de 2,2'-azo-bis-(2-amidinopropano) (AAPH). As duas espécies são ricas em isoflavonoides, mas segundo o achado dos pesquisadores, *P. lobata* tem maior teor em isoflavonoides e atribuem a esse fato, o seu maior poder antioxidante com  $CI_{50}$  no modelo usado de  $194 \pm 6,9 \mu\text{g/mL}$ . Das isoflavonas isoladas, apenas a puerarina (uma isoflavona  $C_8$ -glicosilada) foi ativa,  $CI_{50}$  de  $756,2 \pm 5,0 \mu\text{g/mL}$ , comparável com o padrão de ácido ascórbico usado cuja  $CI_{50}$  foi de  $720,5 \pm 3,6 \mu\text{g/mL}$ .

A busca por antioxidantes naturais se faz necessária, principalmente, porque aqueles utilizados industrialmente como BHT, BHA, dentre outros, apresentam efeitos tóxicos e até cancerígenos (SOARES, 2002).

Os resultados do ensaio se encontram no Gráfico 9.



**Gráfico 9:** CE<sub>50</sub> mais desvio padrão obtidas no ensaio de peroxidação lipídica da fração em hexano (FHA), fração em clorofórmio (FCA) e controles positivos extrato seco padronizado de *Ginkgo biloba* (GB) e Propilgalato (PG).

Analisando os resultados (Gráfico 9) observamos que tanto FHA como FCA preveniram a peroxidação lipídica dos fosfolípeos dos lipossomos induzida pelo sistema Fe<sup>3+</sup>/ascorbato de uma forma dose dependente. Pode-se, portanto, inferir a hipótese que essas amostras possuem capacidade de extinguir o radical hidroxila, potencialmente tóxico, no meio biológico. Esses resultados podem significar uma boa afinidade dos componentes antioxidantes das amostras no meio lipofílico e na interface, podendo atravessar a bicamada lipídica das membranas celulares (TANG e col., 2004). Possivelmente esses efeitos se devem em grande parte a presença de derivados isoflavonoidicos, cuja atividade antioxidante em modelos de peroxidação lipídica tem sido comprovada.

### **Correlação do teor de derivados fenólicos totais com a atividade antioxidante pelo método DPPH**

Os resultados indicam que para *A. nitida* a atividade antioxidante está intimamente relacionada com o a composição fenólica das amostras, especialmente, sendo promovida pelos flavonoides e polifenóis. Deste modo, foi efetuada a correlação da composição de derivados fenólicos com a atividade antioxidante das amostras através da Correlação de Pearson, realizada pelo programa estatístico GraphPad Prism 5.01 com intervalo de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ).

O coeficiente de correlação de Pearson foi significativo para todas as amostras, o que demonstra que a atividade antioxidante está relacionada com a composição fenólica das amostras  $Pearson > 0,9$  para todas as amostras (Tabela 7). Isto indica que os derivados fenólicos contribuem de forma importante para a capacidade antioxidante do extrato e das frações.

**Tabela 7:** Análise estatística pela Correlação de Pearson entre o teor de derivados fenólicos total e a atividade antioxidante obtida pelo método DPPH.

Amostra	Coefficiente de correlação de Pearson – DPPH
EEAA	0,9863
FCA	0,9873
FAEA	0,9976
FBA	0,9943
REEAA	0,9704

EEAA: extrato hidroalcoólico dos galhos de *A. nitida*, FCA: fração em clorofórmio, FAEA: fração em acetato de etila, FBA: fração em butanol e REEAA: resíduo proveniente do liofilizado após as partições.

Chidambaram e colaboradores (2013) encontraram uma alta correlação positiva (coeficiente de correlação = 0,978) entre a quantidade de derivados fenólicos e a atividade antioxidante pelo método DPPH, o que sugere a grande contribuição destas substâncias para o pronunciado potencial antioxidante do extrato das raízes de *Codariocalyx motorius* (Fabaceae). Logo, os resultados obtidos a partir das amostras originadas dos galhos de *A. nitida* são corroborados por outras espécies da família Fabaceae.

#### **Correlação entre o teor de derivados flavonoídicos expressos em biochanina A e quercetina com os valores TEAC encontrados para as amostras**

A atividade antioxidante está intimamente relacionada com o a composição fenólica das amostras, especialmente, sendo promovida pelos flavonoides e polifenóis. Deste modo, foi efetuada a correlação da composição de derivados flavonoídicos tanto expressos como isoflavonoides quanto flavonoides com a atividade antioxidante das amostras obtida pelo TEAC. A análise de correlação de Pearson foi realizada pelo programa estatístico GraphPad Prism 5.01 com intervalo de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ).

Embora o teor de isoflavonoides expressos em biochanina A seja maior do que o teor de flavonoides expresso em quercetina nota-se que não há correlação positiva com atividade antioxidante avaliada pelo TEAC (-0,8790) (Tabela 8). Talvez as isoflavonas não contribuam de forma eficiente, quanto o conteúdo de fenólicos totais de cada amostra e elas não sigam o padrão de atividade do Trolox. Já os flavonoides expressos em equivalente de quercetina apresentam forte correlação (0,8372) com a atividade antioxidante avaliada pelo TEAC, mostrando que estes contribuem de forma significativa para a atividade antioxidante.

**Tabela 8:** Correlação entre o teor de isoflavonoides e flavonoides com a atividade antioxidante determinada pelo TEAC.

Amostras	Teor (%) isoflavonoides expressos Eq Biochanina A	Teor (%) flavonoides expressos Eq quercetina	TEAC	Correlação Isoflavonoides x TEAC	Correlação Flavonoides x TEAC
FAEA	1.115	0.435	0,373	-0,8790	0,8372
EEAA	0.885	0.409	0,693		
REEAA	0.869	0.370	0,516		
FCA	0.697	0.120	0,161		
FBA	0.624	0.455	0,552		

EEAA: extrato hidroalcoólico dos galhos de *A. nitida*, FCA: fração em clorofórmio, FAEA: fração em acetato de etila, FBA: fração em butanol e REEAA: resíduo proveniente do liofilizado após as partições.

### 5.2.2. Potencial antimalárico dos extratos e frações

Diversas famílias de plantas têm sido testadas no intuito de serem encontradas novas alternativas para o tratamento da malária, devido principalmente à resistência crescente de cepas de *P. falciparum* aos medicamentos atualmente utilizados. Encontra-se documentada espécies ativas das famílias: Apocynaceae, Asteraceae, Compositeae, Euphorbiaceae, Rubiaceae, Fabaceae, dentre outras (BOURDY et al., 2004, BERTANI et al., 2005; GARAVITO et al. 2006, RUIZ et al., 2011). Várias espécies da família Fabaceae já apresentaram grande potencial antimalárico (GODEVAC et al., 2008). *A. nitida* (Fabaceae) é uma possível fonte destas substâncias, já que o gênero *Andira* apresenta espécies dotadas de atividade antimalárica como *A. inermis*, relacionada às isoflavonas e aos 2-Arilbenzofuran-3-

carbaldéidos (KRAFT et al., 2000; 2001). Portanto este estudo de caráter inédito é uma possível contribuição para o conhecimento biológico da espécie em questão.

### Teste de inibição do crescimento do *P. falciparum* em cultura *in vitro* (Teste LDH)

O experimento foi realizado como descrito em Material e Métodos pág. 59 em colaboração com o Laboratório de Fitoquímica da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais. O extrato e frações semipurificadas de *A. nitida* apresentaram atividade considerável no ensaio sobre a cultura de *P. falciparum* resistente a cloroquina (W2), efetuado em três ensaios independentes. As amostras mais ativas na concentração de 25 µg/mL foram FCA com 19% de inibição do crescimento, seguida pelo REEAA com 16%, FBA com 15% e FHA com 11%. O extrato bruto hidroalcoólico (EEAA) e a fração acetato de etila (FAEA) foram as menos efetivas contra *P. falciparum* com 3 e 5% de inibição, respectivamente. O extrato lipofílico (EHDA) dos galhos de *A. nitida* foi inativo neste teste de triagem.

Na concentração de 50 µg/mL destacaram-se as frações FCA e FHA, as menos polares, ambas com 31% de inibição. Em seguida, aparece a FBA com 23%, resíduo com 18%, FAEA com 10% e EEAA com 9%.

As porcentagens de inibição do experimento são apresentadas na Tabela 9.

**Tabela 9:** Percentual de redução do crescimento de *P. falciparum* cloroquina-resistente (W2) na presença amostras obtidas de *A. nitida*.

Conc. (µg/mL) Amostras	% Redução do crescimento de <i>P. falciparum</i> (W2)						
	EHDA	FCA	EEAA	FAEA	FBA	FHA	REEAA
50	Inativo	31	9	10	23	31	18
25	Inativo	19	3	5	15	11	16

EHDA: extrato lipofílico dos galhos de *A. nitida*, FCA: fração em clorofórmio, EEAA: extrato hidroalcoólico dos galhos de *A. nitida*, FAEA: fração em acetato de etila, FBA: fração em butanol, FHA: fração em hexano e REEAA: resíduo proveniente do liofilizado após as partições.



Diferentes classes de metabólitos secundários como terpenos (MESHNICK, 2002), flavonoides (FROELICH et al., 2007) e alcaloides (CHEA et al., 2007) têm sido reportados na literatura como possuidores de atividade antimalárica.

No presente experimento as frações menos polares destacaram-se pela atividade antiplasmodial *in vitro*, fato este corroborado por Kraft et al. (2000) que avaliaram a atividade antiplasmodial dos extratos lipofílicos obtidos a partir das folhas e galhos de *Andira inermis*, os quais apresentaram atividade moderada *in vitro*,  $CI_{50}$  de 56,0 e 58,6  $\mu\text{g/mL}$  para o extrato lipofílico das folhas frente as cepas poW (cepa sensível à cloroquina) e Dd2 (cepa resistente à cloroquina), respectivamente. Enquanto o extrato lipofílico dos galhos teve  $CI_{50}$  de 82,0 (poW) e 108,7 (Dd2)  $\mu\text{g/mL}$ . As isoflavonas isoladas foram ativas contra *P. falciparum* tanto frente a Dd2 quanto a poW. As  $CE_{50}$  em  $\mu\text{g/mL}$  para as isoflavonas isoladas foram: Formononetina (>50,0 poW, >50,0 Dd2), Prunetina (27,8 poW, 50 Dd2), Biochanina A (46,8 poW, 50 Dd2), Calicosina (4,2 poW, 9,8 Dd2), Genisteína (2,0 poW, 4,1 Dd2) e Pratenseína (45 poW, 50 Dd2). As mais ativas foram Calicosina e Genisteína. Em 2001, Kraft e colaboradores deram continuidade a busca de produtos naturais com atividade antiplasmodica. Testaram diversos derivados isoflavonoídicos isolados das frações ativas obtidas a partir dos extratos das folhas de *A. inermis* contra *P. falciparum*, sendo que uma ainda não havia sido avaliada por eles: a Afrormosina ( $36,6 \pm 3,3 \mu\text{g/mL}$  poW;  $38,5 \pm 7,3 \mu\text{g/mL}$  Dd2), que também demonstrou atividade contra o parasito no ensaio *in vitro*. Por outro lado, as substâncias isoladas 2-Arilbenzofuran-3-carbaldeídos, os Andinermal A ( $2,3 \pm 0,4 \mu\text{g/mL}$  poW;  $3,9 \pm 0,2 \mu\text{g/mL}$  Dd2) e C ( $5,9 \pm 0,5 \mu\text{g/mL}$  poW,  $6,3 \pm 1,0 \mu\text{g/mL}$  Dd2) demonstraram atividade antiplasmodial pronunciada.

Esses dados reforçam os resultados obtidos pela fração em clorofórmio (FCA), uma vez que, ela apresenta considerável conteúdo flavonoídico expresso em isoflavonas (6,97 mg EB/ g amostra). Para a fração em hexano (FHA) não foi realizada a determinação do conteúdo flavonoídico, contudo não se descarta a possibilidade da presença de derivados isoflavonoídicos, uma vez que esse tipo de substância tem sido descrita para o gênero *Andira*, a partir de extratos e frações lipofílicas, como benzeno, hexano, éter de petróleo, éter etílico, diclorometano, clorofórmio, entre outros (COCKER et al., 1962; BRAZ-FILHO et al., 1973; KRAFT et al., 2000, 2001, 2002; ALMEIDA et al., 2008).

As isoflavonas foram isoladas de todas as espécies de *Andira* estudadas até o presente momento (BRAZ-FILHO et al., 1973, KRAFT et al., 2000 e 2001, SILVA et al., 2006, ALMEIDA et al., 2007, SILVA et al., 2008, GARCEZ et al., 2010). Pode-se sugerir que elas,

além de marcadores quimiossistemáticos, sejam as responsáveis em parte pela atividade antimalárica do gênero. As isoflavonas também possuem atividade contra outros protozoários como *Leishmania donovani* e *Trypanosoma brucei brucei* como a genisteína, a biochanina A, a formononetina e 7-hidroxi-isoflavona (SALEM & WERBOVETZ, 2006)

A atividade baixa do EEAA pode ser justificada pela reduzida concentração das substâncias ativas, pois ele reúne todos os tipos de substâncias e com o fracionamento ocorre a separação e concentração dessas substâncias nas diversas frações. A FBA também apresentou resultados interessantes que também são embasados pela literatura que mostra trabalhos, nos quais compostos fenólicos apresentaram atividade antimalárica (KRAFT et al., 2000, 2001).

No entanto, é importante lembrar que falta de atividade de extratos de plantas *in vitro* não deve ser interpretada como inatividade *in vivo* contra a malária, por diferentes razões, por exemplo, os limites biológico e fitoquímico do teste, como a biodistribuição e o processo de extração (RUIZ et al., 2011).

#### **Teste espectrofotométrico de inibição da polimerização da ferriprotoporfirina (FBIT) ou inibição da polimerização do heme**

Para colocar este modelo em funcionamento dentro das nossas condições, foi necessário otimizar parâmetros, tais como, qualidade da água usada (deve ser destilada e deionizada), concentração de hemina, tipo de placa 96 poços, velocidade e força de centrifugação, entre outros, como a desocupação das placas durante os descartes finais que é um ponto crítico neste modelo, já que pode dar origem a uma grande variabilidade nos resultados dos ensaios. Uma vez estabelecidas as condições do ensaio, utilizaram-se lotes de cloroquina diferentes (da Colômbia e Merck Brasil) para determinação da  $CI_{50}$  e comparação das mesmas. Inicialmente, testaram-se várias concentrações para se determinar a  $CI_{50}$  em nossas condições.

Uma vez padronizadas as variáveis em nossas condições de trabalho, as amostras obtidas a partir dos galhos de *Andira nitida* foram testadas de acordo com o descrito na parte de Material e Métodos, pág. 60, usando a cloroquina difosfato Merck como referência.

O ensaio FBIT é um método simples e menos dispendioso comparado aos outros métodos de avaliação da atividade antimalárica *in vitro*. Desta forma, a implementação desse método para a avaliação de extratos vegetais é vantajoso e menos laborioso do que o teste de cultura *in vitro* do *Plasmodium falciparum*, devido às dificuldades de manutenção do cultivo.

O método de Garavito e colaboradores (2006) foi utilizado com pequenas modificações como descrito em Material e Métodos pág. 60. No intuito de serem encontradas as condições ideais, diversos ensaios foram feitos para que a concentração de hemina ideal fosse encontrada (0,25 mg/mL) e a velocidade/força de centrifugação (800 gravidades) fosse definida.

Neste teste, apesar do extrato hidroalcoólico de *A. nitida* ser inativo, avaliaram-se suas frações enriquecidas e estas se mostraram ativas. As  $CE_{50}$  das amostras variaram de 0,412-1,12 mg/mL, sendo a fração em clorofórmio (FCA) a mais ativa, seguida pelo extrato lipofílico (EDHA), fração em hexano (FHA) e fração em acetato de etila (FAEA). Os resultados do teste encontram-se sumarizados na Tabela 10.

**Tabela 10:**  $CE_{50}$  médias com desvio padrão obtidas pela avaliação da atividade sobre a polimerização da hemina medida por três ensaios independentes dos extratos e frações de *A. nitida*.

Amostra	Status	$CE_{50}$ mg/mL $\pm$ DP
EEAA	Inativo	–
EHDA	Ativo	0,6737 $\pm$ 0,0571 <sup>a</sup>
FHA	Ativa	0,7093 $\pm$ 0,0774 <sup>a</sup>
FCA	Ativa	0,4127 $\pm$ 0,0828
FAEA	Ativo	1,1193 $\pm$ 0,1463
FBA	Inativo	–
REEAA	Inativo	–
Cloroquina	Ativa	0,008 $\pm$ 0,001

Letras iguais indicam médias iguais de acordo com análise estatística por ANOVA/Teste de Tukey  $p < 0,05$ . DP: desvio padrão de 3 repetições. EEAA: extrato hidroalcoólico dos galhos de *A. nitida*, EHDA: extrato lipofílico dos galhos de *A. nitida*, FHA: fração em hexano, FCA: fração em clorofórmio, FAEA: fração em acetato de etila, FBA: fração em butanol e REEAA: resíduo proveniente do liofilizado após as partições.

Novamente, as frações de baixa a média polaridade demonstram maior atividade antimalárica. O conteúdo flavonoídico da FCA é promissor e parece ser constituído majoritariamente por derivados isoflavonoídicos (6,97 mg EB/ g amostra). Dessa forma, reforça-se o papel dessas substâncias na atividade sobre a polimerização da hemina, uma vez que elas também apresentam atividade contra *P. falciparum in vitro* (KRAFT et al., 2000; 2001). CHONG & SULLIVAN JR (2003) avaliaram a atividade inibidora da biocristalização

do heme de várias substâncias. Levando em consideração o trabalho de Kraft e seus colaboradores, os autores testaram a biochanina A e a genisteína, as quais foram ativas com  $CI_{50}$  de 20,8 ( $\pm 1,1$ )  $\mu M$  e 36,2 ( $\pm 3,4$ )  $\mu M$ , respectivamente.

Tanto derivados terpênicos (FERREIRA et al., 2010) quanto isoflavonas são relatados na literatura como antimaláricos (KRAFT et al., 2000; 2001), além de outras substâncias de variada natureza química como as antraquinonas, alcaloides, flavonoides, limonoides, naftoquinonas, sesquiterpenos, quassinoides (CARABALLO et al., 2004)

Bourdy e colaboradores (2004) fizeram a seguinte classificação de atividade antimalárica no teste FBIT a partir da  $CE_{50}$  mg/mL: menor do que 5: extrato ativo, de 5 a 10: extrato moderadamente ativo e maior do que 10: extrato inativo. Segundo esta classificação percebe-se que as amostras provenientes do extrato hidroalcoólico de *A. nitida* são classificadas como ativas, pois nelas se observa  $CE_{50}$  menores do que 5 mg/mL. Os autores realizaram uma verificação de diversas espécies vegetais, dentre elas 2 espécies pertencentes à família Fabaceae, sendo elas *Enterolobium contortisiliquum* (Vell. Conc.) Morong. (folhas –  $CE_{50}$  0,41  $\pm$  0,01 mg/mL), *Geoffroea decorticans* (Gill. Ex Hook. & Arn.) Bruk. (folhas – 0,45  $\pm$  0,12; galhos – 1,00  $\pm$  0,12 mg/mL) e *Caesalpinia paraguariensis* (Parodi) Burk. (sementes – 1,70  $\pm$  0,25) (BOURDY et al., 2004). Resultados estes próximos àqueles obtidos com *A. nitida*.

Bertani e colaboradores (2005), ao avaliarem plantas tradicionalmente antimaláricas da Guiana Francesa, testaram a espécie *Pterocarpus rohrii* Vahl (Fabaceae), a qual inibiu quase 60% do crescimento do *Plasmodium yoelii* no teste *in vivo*, mas foi inativa *in vitro* contra o *P. falciparum* e apresentou  $CE_{50} > 180$   $\mu g/mL$  no teste FBIT, por outro lado é mais ativa do que as frações e extratos de *A. nitida* no FBIT.

Ruiz e colaboradores (2011) realizaram a avaliação do potencial antimalárico de plantas usadas por grupos amazônicos à beira do Rio Nanay (Peru). Dentre elas testaram a atividade antimalárica do extrato dos galhos de *Senna reticulata* (Willd.) H. Irwin & Barneby (Fabaceae), o qual apresentou  $CE_{50} > 10$   $\mu g/mL$  para o ensaio *in vitro* contra o *P. falciparum* FCR-3 cloroquina-resistente e 8,7  $\mu g/mL$  no ensaio FBIT, logo maior atividade do que *A. nitida*.

Na busca por substâncias que apresentem atividade antimalárica por inibição da formação de hemozoína pelo parasito, fica evidente o potencial das amostras provenientes de *A. nitida*, as quais podem constituir possíveis alvos para o desenvolvimento de antimaláricos. Frente à necessidade da substância ativa atravessar as membranas biológicas para se

concentrar no vacúolo acídico do parasito e assim produzir a atividade antimalárica em questão. Logo, a FHA e FCA, são promissoras na busca de substâncias de menor polaridade que desempenhem tal atividade.

### **Teste da Supressão da Parasitemia “*in vivo*” (Teste de Peters)**

O teste supressivo de Peters foi realizado como descrito em Material e Métodos pág. 61 e durante os primeiros quatro dias não foram evidenciados sintoma dramáticos da doença. A evolução foi acompanhada pela contagem dos glóbulos vermelhos parasitados em amostras de esfregaços de sangue periférico. No dia 5 aparecem sintomas leves caracterizados por piloereção. Já no dia 7 aparecem marcadamente os sintomas da doença, apresentando-se, nas condições do ensaio, morte dos animais até o dia 12 posterior a infecção. A evolução da parasitemia dos animais pode permanecer indetectável por alguns dias para logo aparecer e ir aumentando até a morte do animal.

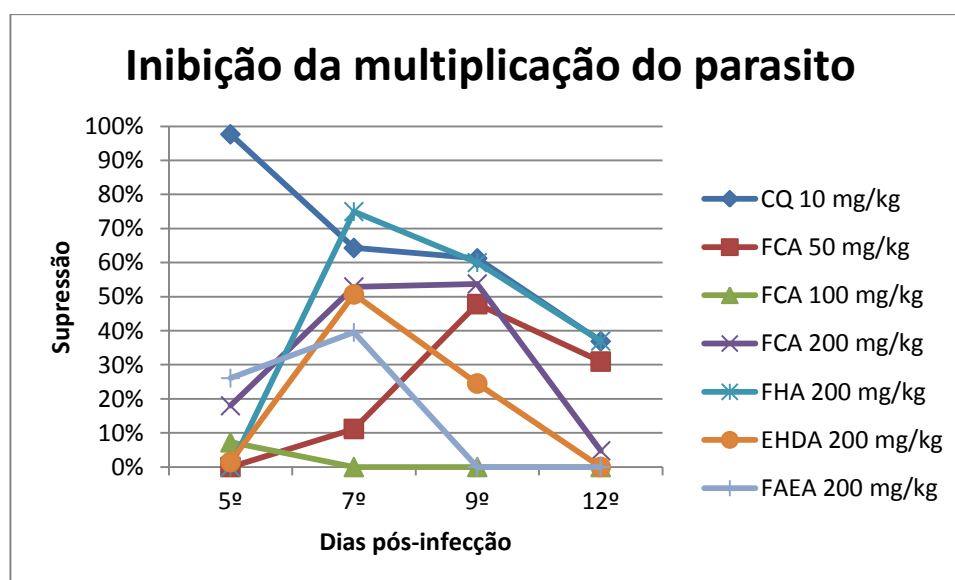
Segundo Krettli e colaboradores (2009) amostras que apresentem 30% ou mais de inibição da multiplicação do parasito podem ser consideradas ativas. Dessa forma, todas as frações e o extrato lipofílico testados apresentaram atividade antimalárica. Destacando-se a fração em hexano, a qual apresentou a maior inibição no 7º dia, 75%, FCA e EDHA apresentaram mais de 50% e FAEA 39%. No 9º dia, ainda pode ser visualizada uma atividade antimalárica considerável das frações FCA 50 mg/Kg (47,83%), FCA 200 mg/Kg (53,75%) e FHA 200 mg/Kg (59,68%) (Tabela 11).

**Tabela 11:** Inibição da multiplicação parasitária quantificada no 5º, 7º, 9º e 12º dia após a infecção.

Amostra	Dose (mg/Kg)	Supressão da parasitemia (%) por dia			
		5º dia	7º	9º	12º
FCA	50	0	11	48	31
FCA	100	7	0	0	0
FCA	200	18	53*	54	5
FHA	200	0	75*	60	37
EHDA	200	1	51*	24	0
FAEA	200	26	39	0	0
CQ	10	98*	64	61	37

n= 5 camundongos por grupo. \*Atividade antimalárica significativa pelo Teste Mann-Whitney comparado ao controle negativo  $p < 0,05$ . CQ: cloroquina, FCA: fração em clorofórmio, FHA: fração em hexano, EHDA: extrato lipofílico dos galhos de *A. nitida* e FAEA: fração em acetato de etila.

No Gráfico 10, encontram-se sumarizados o comportamento das amostras pela inibição da multiplicação parasitária durante o experimento.



**Gráfico 10:** Supressão da parasitemia de camundongos infectados por *P. berghei*, tratados com amostras de *A. nitida* e Cloroquina, nos dias pós-infecção. CQ: cloroquina, EHDA: extrato lipofílico dos galhos de *A. nitida*, FHA: fração em hexano, FCA: fração em clorofórmio, FAEA: fração em acetato de etila.

Muñoz e colaboradores (2000 a e b) realizaram a avaliação de diversas espécies vegetais de variadas famílias no intuito de serem encontradas novas possibilidades para o tratamento da malária. Verificou-se que o extrato hidroalcoólico de *Apuleia leiocarpa* (Fabaceae) nas doses de 100 e 250 mg/Kg apresentou inibição de 53 e 31% sobre a multiplicação de *P. berghei*. Já *Myroxylon peruiferum* 1000 mg/Kg apresentou 35 % de inibição. No mesmo contexto, Bertani e colaboradores (2005) avaliaram o decocto das folhas de *Pterocarpus rohrii* (Fabaceae), o qual foi inativo *in vitro*, mas ativo na dose de 1072 mg/Kg no ensaio *in vivo* com inibição de 59,3%.

Recentemente, Oliveira (2011) em seu trabalho com espécies vegetais da caatinga e região amazônica, avaliou a atividade antimalárica *in vivo* de *Bowdichia virgilioides* Kunth (Fabaceae) que apresentou inibição da parasitemia no 5º dia de 65% (100 mg/Kg) e 38% (500 mg/Kg). Esses resultados reforçam a pesquisa com espécies da família Fabaceae e mostram sua importância na busca por novas fontes de substâncias antimaláricas.

As amostras de *A. nitida* testadas no ensaio contra *P. berghei* foram ativas e essa atividade se repete em várias espécies da família Fabaceae, o que mostra a grande possibilidade de estudos com membros da referida família, no intuito de serem encontradas substâncias antimaláricas.

O tempo de meia-vida das amostras e, conseqüentemente, sua biodisponibilidade pode diminuir e afetar seu efeito biológico. Isto pode explicar alguns resultados obtidos neste trabalho, onde no 5º dia após a infecção as amostras mostram pouca inibição sobre a multiplicação dos parasitos, mas no 7º ocorre uma alta atividade. Neste estudo, as amostras foram administradas por via oral aos animais, considerada como de primeira escolha pela facilidade de adesão ao tratamento principalmente em áreas endêmicas (VIAL et al., 2004).

### **Avaliação da toxicidade**

Usando como parâmetro de toxicidade o número de animais vivos no dia da primeira leitura (no caso, dia 5) do ensaio, foi obtida uma aproximação da viabilidade do emprego de cada extrato ou fração em relação a sua toxicidade, uma vez que no desenho do ensaio, *per si*, expõe os animais a doses repetidas dos tratamentos. A sobrevivência dos animais foi acompanhada até o 37º dia do ensaio. Neste contexto, apesar dos animais estarem vivos na contagem do 5º dia, foi observado que a fração em clorofórmio (FCA) apresentou efeitos tóxicos nos camundongos, evidente no número de animais vivos após esse dia. No 7º dia, havia apenas 2 camundongos nos grupos de 50 mg/Kg peso e 100 mg/Kg peso e 3 animais no

grupo tratado com 200 mg/Kg peso (Tabela 12). A toxicidade já foi relatada no trabalho de Silva e colaboradores (2008) na avaliação da atividade anti-helmíntica de *A. anthelmia*.

Apesar de menos ativa do que as outras amostras testadas neste experimento, a fração em acetato de etila (FAEA) foi aquela que garantiu melhor sobrevida aos animais (31 dias), fato esse corroborado pela presença majoritária de derivados flavonoídicos e outros fenólicos, substâncias antioxidantes, que podem controlar os danos oxidativos decorrentes da infecção, retardando, por exemplo, o quadro de anemia dos camundongos (IBRAHIM et al., 2012), contribuindo para a maior sobrevida dos animais. Em seguida, as frações em clorofórmio e em Hexano a 200 mg/Kg e o extrato lipofílico apresentaram o melhor tempo de sobrevida (27 dias) (Tabela 12). No 37º dia nenhum camundongo mais estava vivo.

**Tabela 12:** Sobrevida dos camundongos por dias pós-infecção com *P. berghei*.

Tratamentos	5º dia	7º dia	9º dia	12º dia	17º dia	21º dia	27º dia	31º dia	37º dia
CN	5/5	4/5	3/5	3/5	2/5	2/5	2/5	1/5	0/5
CQ	5/5	5/5	5/5	4/5	3/5	3/5	3/5	0/5	0/5
G3	5/5	2/5	2/5	2/5	2/5	1/5	0/5	0/5	0/5
G4	5/5	2/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
G5	5/5	3/5	2/5	2/5	2/5	2/5	1/5	0/5	0/5
G6	5/5	3/5	3/5	2/5	1/5	1/5	1/5	0/5	0/5
G7	5/5	4/5	2/5	1/5	1/5	1/5	1/5	0/5	0/5
G8	5/5	4/5	4/5	3/5	3/5	2/5	1/5	1/5	0/5

n = 5 camundongos. CN: controle negativo, CQ: cloroquina, G3: FCA 50 mg/Kg peso, G4: FCA 100 mg/Kg peso, G5: FCA 200 mg/Kg peso, G6: FHA 200 mg/Kg, EMDA: 200 mg/Kg peso e G8: FAEA: 200 mg/Kg peso.

### **Avaliação comparativa dos resultados obtidos nos três modelos usados para verificação do potencial antimalárico**

Não necessariamente se deve encontrar correlação tão alta nos resultados comparativos dos três modelos usados, já que estes avaliam distintos modos de ação das substâncias em relação à atividade antimalárica, embora uma amostra promissora geralmente



apresente atividade em vários modelos. Na Tabela 13 estão agrupados os dados referentes aos três experimentos realizados para avaliação da atividade antimalárica.

O ensaio de triagem pela inibição do crescimento do *P. falciparum* mostrou maior potencial antimalárico das frações menos polares, FHA e FCA, apesar das concentrações-padrão testadas serem demasiadamente baixas, mas estão de acordo com o preconizado pela RITAM. Esse resultado se repetiu na avaliação da inibição da polimerização da ferriprotoporfirina IX, onde FHA, FCA e o extrato lipofílico (EHDA) foram ativos e a FAEA mostrou-se também uma possível fonte de substâncias com atividade antipolimerizante, já as outras amostras se mostraram inativas por esse mecanismo de ação. A fração FCA possui um conteúdo expressivo de isoflavonoides, determinadas pela quantificação de flavonoides expressos em biochanina A, que podem atuar na atividade antimalárica encontrada. Já a fração FHA e o EHDA são compostos de substâncias de baixa polaridade como os terpenos e estes apresentam atividade antimalárica documentada como, por exemplo, a artemisinina.

**Tabela 13:** Resultados da atividade das amostras obtidas a partir dos galhos de *Andira nitida* nos três modelos usados para verificação do potencial antimalárico.

AMOSTRA	Resultados		
	Modelo <i>in vivo</i> * (200 mg/kg)	Modelo <i>in vitro</i> ** (50 µg/mL)	Modelo FBIT*** (CE <sub>50</sub> mg/mL)
EEAA	****	9	-
EHDA	51	-	0,6737 ± 0,0571
FHA	75	31	0,7093 ± 0,0774
FCA	53	31	0,4127 ± 0,0828
FAEA	39	10	1,1193 ± 0,1463
FBA	****	23	-
REEAA	****	18	-
<b>Cloroquina</b>	64	-	0,008 ± 0,001

\* Modelo animal de malária com *P. berghei*, % inibição no 7º dia após infecção dos animais (3 dias após término do tratamento); \*\* Modelo de cultivo de *P. falciparum*, % inibição do crescimento de *P. falciparum*; \*\*\* Modelo de inibição da biocristalização da Ferriprotoporfirina IX, CI<sub>50</sub>, \*\*\*\* Amostra não testada neste modelo, - inativo.

Para o ensaio *in vivo* foram selecionadas as amostras que apresentaram melhor atividade nos dois testes *in vitro* utilizados preliminarmente. Nesse contexto, EHDA, FCA, FHA e FAEA foram testadas e demonstraram considerável atividade antimalárica com inibição de 50,68, 74,66, 52,86 e 39,51 %, respectivamente no 7º dia após a infecção. Portanto, as

amostras provenientes dos galhos de *A. nitida* são possíveis fontes de substâncias antimaláricas.

A inatividade de uma amostra *in vitro*, não pode ser transportada como inatividade *in vivo*, uma vez que os fenômenos metabólicos de um ser vivo influem diretamente sobre as substâncias podendo até mesmo ativá-las (RUIZ et al., 2011). Por isso, é importante a avaliação das amostras por mais de um modelo. No presente estudo, foi confirmada a atividade antimalárica de mais uma espécie do gênero *Andira*, o que contribuiu para o fortalecimento do gênero como possível fonte de substâncias antimaláricas, sendo tanto a FCA quanto FHA promissoras na identificação de novos alvos terapêuticos para o tratamento da malária.

#### **Correlação da atividade antioxidante obtida pela quantificação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (SRAT) e a atividade antimalárica pelo ensaio de inibição da polimerização da ferriprotoporfirina (FBIT), das frações em hexano (FHA) e em clorofórmio (FCA)**

Uma forte correlação entre a atividade antioxidante obtida no ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e a atividade antimalárica obtida pelo ensaio inibição da polimerização da ferriprotoporfirina IX foi encontrada para a FHA (0,9736) e para FCA (0,9643). Esses dados corroboram com a literatura, que mostra o papel dos antioxidantes na fisiopatologia da malária. Níveis aumentados de antioxidante não alteram o curso da doença, mas são úteis no controle do estresse oxidativo proveniente da infecção, diminuindo, por exemplo, o quadro anêmico (IBRAHIM et al., 2012; PERCÁRIO et al., 2012).

A forte correlação existente entre a atividade antioxidante e a atividade antimalárica é bom indicativo no potencial dessas frações frente ao parasito, uma vez que para desenvolverem seu efeito na formação da hemozoína, essas substâncias precisam atravessar as membranas biológicas do *Plasmodium*, para chegarem ao vacúolo alimentar ácido (EGAN, 2008). Dessa forma, reforça-se o interesse nessas amostras na busca de substâncias antimaláricas que consigam chegar até o alvo farmacológico.

Foi encontrada uma considerável atividade antimalárica dessas amostras no ensaio *in vivo* contra *P. berghei* pode também ser reforçada pela correlação existente com os antioxidantes presentes. No caso da FHA são substâncias de baixa polaridade, já FCA apresenta um conteúdo expressivo de isoflavonas. É a primeira vez que essas inéditas atividades biológicas de *A. nitida* são documentadas e reforçam o conhecimento sobre esse

gênero como possível fonte de substâncias para o tratamento da malária e o uso medicinal para o tratamento da malária.

O papel exato dos flavonoides ainda não está totalmente elucidado na malária, mas devido à ação antioxidante, essas substâncias podem atuar no controle dos eventos relativos ao estresse oxidativo, o qual é comum no curso da doença. Portanto, os flavonoides poderiam atuar protegendo as células das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (YENESEW et al., 2012). Neste contexto, a espécie *A. nitida* aparece como promissora em substâncias antimaláricas de natureza flavonoídica, no entanto mais estudos são necessários tanto na elucidação estrutural dessas substâncias quanto no real papel clínico dos flavonoides na malária.

## 6. CONCLUSÃO

As plantas têm sido utilizadas desde a antiguidade para o tratamento de doenças e constitui fonte inesgotável de novos agentes terapêuticos. Dessa forma, o estudo de espécies vegetais brasileiras é interessante, uma vez que, o país apresenta uma das maiores biodiversidades do mundo e com o agravamento das doenças tropicais como a malária se faz urgente a pesquisa por novas possibilidades farmacológicas para o tratamento dessas enfermidades.

Neste contexto, o gênero *Andira* aparece como promissor em atividades biológicas e como foi demonstrado no presente trabalho, *A. nitida* mostra-se como uma nova fonte na busca por substâncias ativas. O estudo fitoquímico mostrou que os galhos são ricos em substâncias do metabolismo secundário com a presença majoritária de derivados fenólicos, dentre estes as isoflavonas. Além disso, as isoflavonas foram evidenciadas pela determinação do conteúdo flavonoídico total. Dessa forma, essas substâncias podem ser consideradas possíveis marcadores quimiosistemáticos do gênero, visto que em todas as espécies de *Andira* estudadas até o presente momento esses constituintes foram identificados.

Constitui estudo inédito a verificação do potencial antioxidante da espécie *A. nitida*, a qual demonstrou alta atividade frente aos variados testes. Logo, na busca por antioxidantes naturais, considerando que os sintéticos largamente utilizados na indústria alimentícia / farmacêutica apresentam toxicidade, essa espécie vegetal abre possibilidades quanto a identificação dessas substâncias e seu possível uso.

A espécie estudada apresentou considerável atividade antiplasmodial / antimalárica tanto *in vitro* quanto *in vivo*, a qual pode constituir fonte de substâncias antimaláricas, destacando-se a capacidade de impedir a formação de hemozoína pelo parasito. Dessa forma, reforça-se o uso medicinal do gênero *Andira* para o tratamento da malária pela população e respalda as pesquisas científicas com as espécies do gênero.

O presente trabalho abre perspectivas para a bioprospecção e possível isolamento das substâncias ativas, visando o possível desenvolvimento de novos antimaláricos, uma vez que com o advento do aumento da resistência aos atuais fármacos, principalmente, por *P. falciparum* surge a necessidade de busca de novos agentes terapêuticos.

## REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA ESTADUAL DE MEIO AMBIENTE. Disponível em: <http://www.cprh.pe.gov.br/rbma/ctudo-arvores-mata-angelim.asp>. Acesso em: 15-07-2013
- ALMEIDA, J. G. L. de; SILVEIRA, E. R. & PESSOA, O. D. L. 2008. NMR spectral assignments of a new [C–O–C] isoflavone dimer from *Andira surinamensis*. **Magnetic Resonance in Chemistry** 46: 103–106.
- ANCELIN, M. L.; CALAS, M.; BONHOURE, A.; HERBUTE, S.; VIAL, H. J. 2003. *In vivo* antimalarial activities of mono- and bis quaternary ammonium salts interfering with *Plasmodium* phospholipid metabolism. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 47(8): 2598-605.
- ANDRES, A.; DONOVAN, S. M.; KUHLENSCHMIDT, M. S. 2009. Soy isoflavones and virus infections. **Journal of Nutritional Biochemistry** 20: 563–569.
- AHMED, A. S.; ELGORASHI, E. E.; MOODLEY, N.; MCGAWA, L. J.; NAIDOO, V.; ELOFF, J. N. 2012. The antimicrobial, antioxidative, anti-inflammatory activity and cytotoxicity of different fractions of four South African *Bauhinia* species used traditionally to treat diarrhoea. **Journal of Ethnopharmacol** 143: 826–839.
- ARRIGONI, O.; DE TULLIO, M. C. 2000. The role of ascorbic acid in cell metabolism: between gene-direct functions and unpredictable chemical reactions. **Journal of Plant Physiology** 157: 481-488.
- ATAMMA, H.; GINSBURG, H. 1993. Origin of reactive oxygen species in erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum*. **Mol Biochem Parasitol** 61:2 31–41.
- BAGOT, S.; NOGUEIRA, F.; COLLETTE, A.; ROSARIO, V.; LEMONIER, F.; CAZENAVE, P. A.; PIED, S. 2004. Comparative study of brain CD8+ T cells induced by sporozoites and those induced by blood-stage *Plasmodium berghei* ANKA involved in the development of cerebral malaria. **Infect Immun.** 72(5): 2817-26.
- BAIRD, J. K. 2009. Resistance to therapies for infection by *Plasmodium vivax*. **Clinical Microbiological Reviews** 22(3): 508 - 534.
- BAELMANS, R.; DEHARO, E.; BOURDY, G.; MUÑOZ, V.; QUENECO, C.; SAUVAIN, M.; GINSBURG, H. 2000. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach: Part IV. Is a new haem polymerisation inhibition test pertinent for the detection of antimalarial natural products? **Journal of Ethnopharmacology** 73: 271-275.
- BARENDT, M.; JAIDEE, A.; KHAOHIRUN, N.; SINGHASIVANON, P.; NOSTEN, F. 2007. *In vitro* activity of ferroquine (SSR 97193) against *Plasmodium falciparum* isolates from the Thai-Burmese border. **Malaria Journal** 6:81.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. 2006. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova** 29( 1): 113-123.

- BECKERA, K.; TILLEYB, L.; VENNERSTROMC, J. L.; ROBERTSD, D.; ROGERSONE, S.; GINSBURG, H. 2004. Oxidative stress in malaria parasite-infected erythrocytes: host-parasite interactions. **International Journal for Parasitology** 34:163–189.
- BECKER, S. I.; WANG, R.; HEDSTROM, R. C.; AGUIAR, J. C.; JONES, T. R.; HOFFMAN, S. L.; GARDNER, M. J. 1998. Protection of mice against *Plasmodium yoelii* sporozoite challenge with *P. yoelii* merozoite surface protein 1 DNA vaccines. **Infection and Immunity** 66(7): 3457-61.
- BERTANI, S.; BOURDY, G.; LANDAU, I.; ROBINSON, J. C., ESTERRE, Ph.; DEHARO, E. 2005. Evaluation of French Guiana traditional antimalarial remedies. **Journal of Ethnopharmacology** 98: 45–54.
- BIANCO, E. M. & SANTOS, C. A. de M. 2010. Propriedades antioxidantes das folhas e caules de *Bauhinia microstachya*. **Revista Brasileira de Biociências** 8(3): 238-241.
- BLOKHINA, O.; VIROLAINEN, E.; FAGERSTEDT, K. V. 2003. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. **Annals of Botany** 91: 179–194.
- BONOLI M, VERARDO V, MARCONI E. 2004. Phenols in barley (*Hordeum vulgare* L.) flour: Comparative spectrophotometric study among extraction methods of free and bound phenolic compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 52: 5195-5200.
- BOTSARIS, A. S. 2007. Plants used traditionally to treat malaria in Brazil: the archives of Flora Medicinal. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine** 3:18.
- BOURDY, G.; OPORTO, P.; GIMENEZ, A.; DEHARO, E. 2004. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach Part VI. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by Isoceño-Guaraní Indians. **Journal of Ethnopharmacology** 93: 269–277.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. 1995. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. **LWT - Food Science and Technology** 28: 25-30.
- BRASIL, Ministério da Saúde; Secretaria de Vigilância Sanitária. 2006. Situação Epidemiológica da Malária. Brasília: Ministério da Saúde.
- BRASIL, Ministério da Saúde – Secretaria de Vigilância Sanitária 2007. Situação epidemiológica da malária no Brasil
- BRASIL, Portal da Saúde, 2009 - <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/> - acesso em 10/12/2011.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Guia tratamento da Malária. 2010. Disponível em: [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia\\_pratico\\_malaria.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_pratico_malaria.pdf)
- BRASIL, Portal da Saúde. 2011. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id\\_area=1526](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1526) - acesso em 06/06/2011.

- BRASIL, Fundação Nacional de Saúde. 2011. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/> - acesso em 10/12/2011.
- BRAZ-FILHO, R.; GOTTLIEB, O. R.; PINHO, S. L. V.; MONTE, F. J. Q.; ROCHA, A. I. 1973. Flavonoids from amazonian leguminosae. **Phytochemistry** 12: 1184.
- BROCKMAN, A.; SINGLAM, S.; PHIAPHUN, L.; LOOAREESUWAN, S.; WHITE, N. J.; NOSTEN, F. 2004. Field evaluation of a novel colorimetric method--double-site enzyme-linked lactate dehydrogenase immunodetection assay to determine drug susceptibilities of *Plasmodium falciparum* clinical isolates from northwestern Thailand. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 48(4):1426-1429.
- CALIXTO, J. B. 2000. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** 33 (2): 179-189.
- CALIXTO, J. B. 2005. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin American: a personal view. **Journal of Ethnopharmacology** 100 (1-2): 131-134.
- CAMPBELL, C. C. 1997. Malaria: an emerging and re-emerging global prague. **FEMS Immunology and Medical Microbiology** 18 (4): 325-331.
- CAGNIN, M. A. H.; GOTTLIEB, O. R. 1978. Isoflavonoids as a systematic markers. **Biochemical Systematics and Ecology** 6(3): 225-238.
- CARABALLO, A.; CARABALLO, B.; RODRÍGUEZ-ACOSTA, A. 2004. Preliminary assessment of medicinal plants used as antimalarials in the southeastern Venezuelan Amazon. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 37(2): 186-188.
- CARVALHO, L. H.; KRETTLI, A. U. 1991. Antimalarial chemotherapy with natural products and chemically defined molecules. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 86(suppl II): 181-184.
- CENTER OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Life Cycle, 2006. Disponível em: [http://www.cdc.gov/malaria/biology/life\\_cycle.htm](http://www.cdc.gov/malaria/biology/life_cycle.htm). Acesso em: 04 de set de 2012).
- CHANG, C-C.; YANG, M-H.; WEN, H-M.; CHERN, J-C. 2002. Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. **Journal of Food and Drug Analysis**, 10(3): 178-182.
- CHAVES, S. S.; RODRIGUES, L. C. 2000. An initial examination of the epidemiology of malaria in the state of Roraima, in the brazilian Amazon basin. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo** 42: 269-275.
- CHEA, A.; HOUT, S.; BUNA, S. S.; TABATADZE, N.; GASQUET, M.; AZAS, N.; ELIAS, R.; BALANSARD, G. J. 2007. Antimalarial activity of alkaloids isolated from *Sthepania rotunda*. **Journal of Ethnopharmacology** 112(1): 132-137.
- CHIDAMBARAM, U.; PACHAMUTHU, V.; NATARAJAN, S.; ELANGO, BHAKKIYALAKSHMI, S.; RAMKUMAR, K. M. 2013. In vitro evaluation of free radical

scavenging activity of *Codariocalyx motorius* root extract. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine** 6(3): 188-194.

- CHONG, C. R.; SULLIVAN JR, D. J. 2003. Inhibition of heme crystal growth by antimalarial and other compounds: implications for drug discovery. **Biochemical Pharmacology** 66: 2201 - 2212.
- CHUN, S. S.; VATTEM, D. A.; LIN, Y. T.; SHETTY, K. 2005. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. **Process Biochemistry** 40: 809-816.
- COCKER, W.; DAHL, T.; DEMPSEY, C.; MCMURRY, T. B. H. 1962. Extractives from woods. Part I. Extractives from *Andira inermis* (Wright) H.B.K. **Journal of the Chemical Society** 4906-4909.
- CONSOLI, R.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. 1994. *Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil*, Ed. Fiocruz. 225 pp.
- COPPI, A.; CABINIAN, M.; MIRELMAN, D.; SINNIS, P. 2006. Antimalarial activity of Allicin, a biologically active compound from garlic cloves. **Antimicrobial Agents Chemotherapy** 50: 1731-1737.
- CORRALES, R. C. N. R.; SOUZA, N. B.; PINHEIRO, L. S.; ABRAMO, C.; COIMBRA, E. S.; SILVA, A. D. 2011. Thiopurine derivatives containing triazole and steroid: Synthesis, antimalarial and antileishmanial activities. **Biomedicine & Pharmacotherapy** 65:198–203.
- COTELLE, N.; BERNIER, J-L.; CATTEAU, J-P.; POMMERY, J.; WALLET, J-C.; GAYSOU, E.M. 1996. Antioxidant properties of hidroxi-flavones. **Free Radical Biology & Medicine** 20 (1): 35-43.
- CRUZ, A. M. 1987. Human migration and the spread of Malaria in Brazil. **Parasitology Today** 3 (6): 166-170.
- CUNICO, W.; CARVALHO, S. A.; GOMES, C. R. B.; MARQUES, G. H. 2008. Fármacos Antimalariais História e Perspectivas. **Revista Brasileira de Farmacognosia** 89: 49-55.
- DATTANI, J. J.; RAJPUT, D. K.; MOID, N.; HIGHLAND, H. N.; GEORGE, L. B.; DESAI, K. R. 2010. Ameliorative effect of curcumin on hepatotoxicity induced by chloroquine phosphate. **Environmental Toxicology and Pharmacology** 30: 103–109.
- DAILY, J. P. 2006. Antimalarial Drug Therapy: The Role of Parasite Biology and Drug Resistance. **J Clin Pharmacol.**, 46:1487-1497
- DEHARO, E.; GAUTRET, P.; MUÑOZ, V.; SAUVAIN, M. 2000. Técnicas de laboratório para la selección de sustancias antimaláricas. CYTED - IRD
- DESJARDINS, R. E.; CANFIELD, C. J.; HAYNES, J. D.; CHULAY, J. D. 1979. Quantitative assessment of antimalarial activity *in vitro* by a semiautomated microdilution technique. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 16(6): 710-718.



- DONDORP, A. M.; YEUNG, S.; WHITE, L.; NGUON, C.; DAY, N. P. J.; SOCHEAT, D.; von SEIDLEIN, L. 2010. Artemisinin resistance: current status and scenarios for containment. **Nature Reviews. Microbiology** 8: 272-280.
- DONDORP, A. M.; ANGUS, B. J.; CHOTIVANICH, K.; SILAMUT, K.; RUANGVEERAYUTH, R.; HARDEMAN, M. R.; KAGER, P. A.; VREEKEN, J.; WHITE, N. J. 1999. Red blood cell deformability as a predictor of anemia in severe falciparum malaria. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 60: 733–737.
- DORNAS, W. C.; OLIVEIRA, T. T.; RODRIGUES-DAS-DORES, R. G.; SANTOS, A. F.; NAGEM, T.J. 2007. Flavonóides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada** 28(3): 241- 249.
- DORN, A.; VIPPAGUNTA, S. R.; MATILE, H.; JAQUET, C.; VANNERSTROM, J. L.; RIDLEY, R. G. 1998. An assessment of drug–haematin binding as a mechanism for inhibition of haematin polymerisation by quinoline antimalarials. **Biochemical Pharmacology** 55, 727–736.
- ECKSTEIN-LUDWIG, U.; WEBB, R. J.; VAN GOETHEN, I. D.; EAST, J. M.; LEE, A. G.; KIMURA, M.; O'NEILL, P. M.; BRAY, P. G.; WARD, S. A.; KRISHNA. S. 2003. Artemisinins target the SERCA of *Plasmodium falciparum*. **Nature** 424: 957-961.
- EGAN, T. J. 2008. Haemozoin formation. **Molecular & Biochemical Parasitology** 157: 127-136.
- ESTEVEZ, E. A. & MONTEIRO, J. B. R. 2001. Efeitos benéficos de isoflavonas em doenças crônicas. **Revista de Nutrição** 14(1): 43-52
- ESTEVEZ, Y.; CASTILLO, D.; TANGO, A.; PISANGO, M.; AREVALO, J.; ROJAS, S.; ALBAN, J.; DEHARO, B.; BOURDY, G.; SAUVAIN, M. 2007. Evaluation of the leishmanicidal activity of plants used by Peruvian Chayahuita group. **Journal of Ethnopharmacology** 114: 257-259.
- FATTORUSSO, E.; TAGLIALATELA-SCAFATI, O. 2009. Marine Antimalarials. **Marine Drugs** 7: 130-152.
- FERREIRA, J. F.; LUTHRIA, D. L.; SASAKI, T.; HEYERICK, A. 2010. Flavonoids from *Artemisia annua* L. as antioxidants and their potential synergism with artemisinin against malaria and cancer. **Molecules**, 15: 3135-3170.
- FERRARI, C. K. B. & TORRES, E. A. F. da S. 2002. Novos compostos dietéticos com propriedades anticarcinogênicas. **Revista Brasileira de Cancerologia**, 48(3): 375-382.
- FIDOCK, D. A.; ROSENTHAL, P. J.; CROFT, S. L.; BRUN, R.; NWAKA, S. 2004. Antimalarial drug discovery: efficacy model for compound screening. **Marine Drugs** 3: 509-517.
- FINKEL, T.; HOLBROOK, N.J. 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature** 408(6809): 239-47.

- FROELICH, S.; ONEGI, B.; KAKOOKO, A.; SIEMS, K.; SCHUBERT, C.; JANETT-SIEMS, K. 2007. Plants traditionally used against malaria: phytochemical and pharmacological investigation of *Momordica foetida*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy** 17(1): 01-07.
- FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ (FIOCRUZ). Mapa com dados da incidência parasitária anual da malária. 2013. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/ccs/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=1278&sid=9>. Acesso em: 15/07/2013
- FRANÇA, T. C. C.; SANTOS, M. G.; FIGUEROA-VILLAR, J. D. 2008. Malaria: aspectos históricos e quimioterapia. **Química Nova** 31(5): 1271-1278.
- GARAVITO, G.; ARTEAGA, L.; ACEBEY, L. 2002. La biocristalización del heme como una potencial diana farmacológica em el desarrollo de fármacos para el tratamiento de la malaria. **Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas** 31: 85-95.
- GARAVITO, G.; RINCÓN, J.; ARTEAGA, L.; HATA, Y.; BOURDY, G.; GIMENEZ, A.; PINZÓN, R.; DEHARO, E. 2006. Antimalarial activity of some Colombian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology** 107: 460–462.
- GARCEZ, W. S.; GARCEZ, F. R., TIEPPO, C., FREITAS, O. N. de, HAMERSKI, L. 2010. Isoflavones and flavonols from *Andira humilis*. **Biochemical Systematics and Ecology** 38: 1242–1245.
- GAUTRET, P, CHABAUD, A. G.; LANDAU, I. 1995. *Plasmodium vinckei vinckei* and *P. yoelii nigeriensis*: pattern of gametocyte production and development. **Parassitologia** 37(1):17-24.
- GHASHGAEINIA, M.; BOBBALA, D.; WIEDER, T.; KOKA, S.; BRUCK, J.; FEHRENBACHER, B.; ROCKEN, M.; SCHALLER, M.; LANG, F.; GHORESCHI, K. 2010. Targeting glutathione by dimethylfumarate protects against experimental malaria by enhancing erythrocyte cell membrane scrambling. **American Journal of Physiology. Cell Physiology**. 299, C791–C804.
- GINSBURG, H.; ATAMMA, H. 1994. The redox status of malaria-infected erythrocytes: an overview with an emphasis on unresolved problems. **Parasite** 1:5–13.
- GINSBURG, H.; DEHARO, E. 2011. A call for using natural compounds in the development of new antimalarial treatments—an introduction. **Malaria Journal**, 10(Suppl 1):S1
- GODEVAC, D.; ZDUNIC, G.; SAVIKIN, K.; VAJS, V.; MENKOVIC, N. 2008. Antioxidant activity of nine Fabaceae species growing in Serbia and Montenegro. **Fitoterapia** 79: 185-187.
- GOLENSER, J.; WAKININE, J. H.; KRUGLIAK, M.; HUNT, N. H.; GRAU, G. E. 2006. Current perspectives on the mechanism of action of artemisinins. **International Journal of Parasitology** 36: 1427-1441.
- GOMES, B. A. Q. Efeitos da Suplementação com Antioxidantes Sobre as Alterações Oxidativas Cerebrais e Pulmonares em Malária Murina. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Pará, PA, Brasil, Novembro 2011.

- GRIFFITHS, M. J.; NDUNGU, F.; BAIRD, K. L.; MULLER, D. P.; MARSH, K.; NEWTON, C. R. 2001. Oxidative stress and erythrocyte damage in Kenyan children with severe *Plasmodium falciparum* malaria. **British Journal of Haematology** 113: 486–491.
- GUHA, M.; KUMAR, S.; CHOUBEY, V.; MAITY, P.; BANDYOPADHYAY, U. 2006. Apoptosis in liver during malaria: role of oxidative stress and implication of mitochondrial pathway. **FASEB J** 20:1224–1226.
- HAY, S. I.; GUERRA, C. A.; TATEM, A. J.; NOOR, A. M.; SNOW, R.W. 2004. The global distribution and population at risk of malaria: past, present and future. **The Lancet Infectious Diseases** 4(6): 327-336.
- HAYSTEEN, B. H. 2002. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology & Therapeutics** 96: 67– 202.
- HOPPE, H. C.; SCHALKWY, D. A.; WIEHART, U. I.; MEREDITH, S. A.; EGAN, J.; WEBER, B. W. 2004. Antimalarial quinolines and artemisinin inhibit endocytosis in *Plasmodium falciparum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 48: 2370-2378.
- HOUGHTON, P. J.; ZARKA, R.; HERAS, B. L.; HOULT, J. R. S. 1995. Fixed oil of *Nigella sativa* and derived thymoquinone inhibit eicosanoid generation in leukocytes and membrane lipid peroxidation. **Planta Medica** 61: 33-36.
- HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 53(6): 1841-1856.
- IBRAHIM, M. A.; ISAH, M. B.; OKAFOR, A. I.; BASHIR, M.; BISALLA, M.; UMAR, I. A. Umar. 2012. Effects of combined administration of vitamins C and E on some *Plasmodium berghei*-induced pathological changes and oxidative stress in mice. **Comp Clin Pathol** 21:1677–1682.
- IKAWA, M.; SCHAPER, T. D.; DOLLARD, C. A.; SASNER, J. J. 2003. Utilization of Folin-Ciocalteu phenol reagent for the detection of certain nitrogen compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 51: 1811-1815.
- IOSET, J. R. 2008. Natural Products for Neglected Diseases: A Review. **Curr. Org. Chem.** 12 (8): 643-666.
- JIANG, R-W.; LAU, K-M.; YAM, W-S; LEUNG, L.K.; WOO, K-S; FUNG, K-P. 2005. A comparative study on aqueous root extracts of *Pueraria thomsonii* and *Pueraria lobata* by antioxidant assay and HPLC fingerprint analysis. **Journal of Ethnopharmacology** 96: 133-138.
- KAR, S.; KAR, S. 2010. Control of malária. **Nature Reviews - Drug Discovery** 9: 511-512.
- KATSURAGAWA, T. H.; GIL, L. S.; TADA, M. S.; SILVA, L. H. P. DA. 2008. Endemias e epidemias na Amazônia. Malária e doenças emergentes em áreas ribeirinhas do Rio Madeira. Um caso de escola. **Estudos Avançados** 22 (64): 111-141.

- KAUR, K.; JAIN, M.; KAUR, T.; JAIN, R. 2009. Antimalarials from nature. **Bioorganic & Medicinal Chemistry** 17 (9): 3229-3256.
- KOLEVA, I. I.; van BEEK, T. A.; LINSSEN, J. P. H.; de GROOT, A.; EYSTATIEVA, L. N. 2001. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. **Phytochemical Analysis** 13: 8–17.
- KLEIN, T. A., TADA M. S.; LIMA, J. B.; KATSURAGAWA, T. H. 1991. Infection of *Anopheles darlingi* fed on patients infected with *Plasmodium vivax* before and during treatment with chloroquine in Costa Marques, Rondonia, Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 45(4): 471-478.
- KRAFT, C., JENETT-SIEMSA, K., SIEMSB, K., GUPTA, M. P., BIENZLE, U., EICH, E. 2000. Antiplasmodial activity of isoflavones from *Andira inermis* **Journal of Ethnopharmacology** 73: 131–135.
- KRAFT, C., JENETT-SIEMSA, K., SIEMSB, K., SOLISC, P. N., GUPTAC, M. P., BIENZLE, U., EICH, E. 2001. Andinermals A–C, antiplasmodial constituents from *Andira inermis*. **Phytochemistry** 58: 769–774.
- KRAFT, C.; JENETT-SIEMS, K.; KÖHLER, I.; SIEMS, K.; ABBIW, D.; BIENZLE, U.; EIXH, E. 2002. Andinol A and B, Two unique 6-hydroxymethylpterocarpenes from *Andira inermis*. **Z. Naturforsch** 57c: 785-790.
- KRETTLI, A. U.; ANDRADE-NETO, V. F.; BRANDÃO, M. das G. L.; FERRARI, W. M. S. 2001. The Search for New Antimalarial Drugs from Plants Used to Treat Fever and Malaria or Plants Randomly Selected: a Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 96(8): 1033-1042.
- KRETTLI, A. U.; ADEBAYO, J. O.; KRETTLI, L. G. 2009. Testing of Natural Products and Synthetic Molecules Aiming at New Antimalarials. **Current Drug Targets** 10: 261-270.
- KUMAR, R. S.; RAJKAPOOR, B.; PERUMAL, P. 2012. Antioxidant activities of *Indigofera cassioides* Rottl. Ex. DC. Using various in vitro assay models. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine** 2(4): 256-261.
- KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A. G.; GARCÍA-PARILLA, M. C.; TRONCOSO, A. M.; FETT, R. 2004. Actividad antioxidante de pigmentos antocianicos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos** 24(4): 691-693.
- LEE, W-C.; CHIN, P-W.; LAU, Y-L.; CHIN, L-C.; FONG, M-Y.; YAP, C-J.; SUPRAMANIAM, R. R.; MAHMUD, R. 2013. Hyperparasitaemic human *Plasmodium knowlesi* infection with atypical morphology in peninsular Malaysia. **Malaria Journal** 12:88
- LEITE, J.P.V. Estudo fitoquímico de folhas de *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reiss e variação sazonal e intra-específica de polifenóis em populações nativas. 2002. 299f. Tese (Doutorado em Ciências - Química), Depto Química, ICEX, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2002.
- LEWIS, G.P. 1987. *Legumes da Bahia*. Royal Botanic Gardens. Kew.

- LIU, G.; M. A. J.; CHEN, Y.; TIAN, Q.; SHEN, Y.; WANG, X.; CHEN, B.; YAO, S. 2009. Investigation of flavonoid profile of *Scutellaria bacalensis* Georgi by high performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ion trap mass spectrometry. **Journal of Chromatography A** 1216 (23): 4809–4814.
- LOOAREESUWAN, S.; WILAIRATANA, P.; VANNAPHA, S.; et al. 1998. Pentoxifylline as an ancillary treatment for severe falciparum malaria in Thailand. **American Journal of Tropical Medicine Hygiene** 58: 348-353.
- LOTUFO, P. "*HowStuffWorks - Como funciona a malária no Brasil*". Publicado em 06 de dezembro de 2007 (atualizado em 18 de setembro de 2008) <http://saude.hsw.uol.com.br/malaria-brasil3.htm> (26 de maio de 2012).
- LUENGAS-CAICEDO, P.E. Contribuição para a padronização de extratos de folhas de *Cecropia glaziovii* Snethl.: estudos de variação sazonal e intra-específica de flavonóides e proantocianidinas, de metodologias de extração e de atividade vasorrelaxante. Belo Horizonte: 2005. 259f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas), Faculdade de Farmácia da UFMG, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2005.
- MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. 1970. The Systematic Identification of Flavonoids. Springer-Verlag, New York, Heidelberg, Berlin. 354p.
- MARIATH, I. R.; FALCÃO, H. de S.; BARBOSA-FILHO, J. M., SOUSA, L. C. F. de S.; TOMAZ, A. C. de A.; BATISTA, L. M.; DINIZ, M. de F. F. M.; ATHAYDE-FILHO, P. F.; TAVARES, J. F., SILVA, M. S., CUNHA, E. V. L. 2009. Plants of the American continent with antimalarial activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia** 19(1A): 158-192.
- MARTINS, S. S.; BIONDI, D. 1990. Observações preliminares do "Angelim" (*Andira nitida* Mart. ex Benth) para uso na arborização urbana. **Acta Botanica Brasilica** 4:(2) supl.1 137-144.
- MATOS, N. F. 1979. O gênero *Andira* Lam. (Leguminosae:Papilionoideae) no Brasil. **Acta Amazonica** 9: 241-266.
- MAYER, D. C.; COFIE, J.; JIANG, L.; HARTL, D. L.; TRACY, L.; KABAT, J.; MENDOZA, L. H.; MILLER, L. H. 2009. Glycophorin B is the erythrocyte receptor of *Plasmodium falciparum* erythrocyte-binding ligand, EBL-1. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 106: 5348–5352 .
- MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO, G. G.; REIS, A. S.; dos SANTOS, T. C.; COUBE, C. S.; LEITÃO, S. G. 2001. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research** 15: 127-130.
- MESHNICK, S. R. 2002. Artemisinin: mechanisms of action, resistance and toxicity. **International Journal of Parasitology** 32: 1655–1660.
- MESQUITA, M. L. de; GRELLIER, P.; MAMBU, L.; PAULA, J. E. de, ESPINDOLA, L. S. 2007. In vitro antiplasmodial activity of Brazilian Cerrado plants used as traditional remedies. **Journal of Ethnopharmacology** 110: 165–170.

- METZGER, A.; MUKASA, G.; SHANKAR, A.H.; NDEEZI, G.; MELIKIAN, G.; SEMBA, R.D. 2001. Antioxidant status and acute malaria in children in Kampala, Uganda. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 65, 115–119.
- MILIAUSKAS, G.; VENSKUTONIS, P. R. & van BEEK, T. A. 2004. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. **Food Chemistry** 85: 231–237.
- MILLER, N. J.; RICE-EVANS, C. A. 1996. Spectrophotometric determination of antioxidant activity. *Redox Report* 2, 161–171.
- MIYASE, T.; SANO, M.; NAKAI, H.; MURAOKA, M.; NAKAZAWA, M.; SUZUKI, M.; YOSHINO, K.; NISHIHARA, Y.; TANAI, J. 1999a. Antioxidants from *Lespedeza homoloba* (I). **Phytochemistry** 52(2):303-10.
- MIYASE, T.; SANO, M.; YOSHINO, K.; NONAKA, K. 1999b. Antioxidants from *Lespedeza homoloba* (II). **Phytochemistry** 52: 311-319.
- MONTEIRO J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; ARAÚJO, E. L.; AMORIM, E. L. C. 2005 Taninos: uma abordagem da química a ecologia. **Química Nova** 28: 892-896.
- MULLER, S. 2004. Redox and antioxidant systems of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Molecular Microbiology** 53: 1291–1305.
- MUÑOZ, V.; SAUVAIN, M.; BOURDY, G.; CALLAPA, J.; BERGERON, S.; ROJAS, I.; BRAVO, J. A.; BALDERRAMA, L.; ORTIZ, B.; GIMENEZ, A.; DEHARO, E. 2000 a. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach Part I. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by the Chacobo Indians. **Journal of Ethnopharmacology** 69 127–137.
- MUÑOZ, V.; SAUVAIN, M.; BOURDY, G.; CALLAPA, J.; BERGERON, S.; ROJAS, I.; BRAVO, J. A.; BALDERRAMA, L.; ORTIZ, B.; GIMENEZ, A.; DEHARO, E. 2000 b. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach Part III. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by Alteños Indians. **Journal of Ethnopharmacology** 71: 123–131.
- NACZK, M.; SHAHIDI, F. 2004. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A** 1054: 95-111.
- NANDA, R.; MISHRA, P. K.; DAS, U. K.; ROUT, S. B.; MOHAPATRA, P. C.; PANDA, A. 2004. Evaluating role of oxidative stress in determining the pathogenesis of falciparum malaria induced acute renal failure. **Indian Journal of Clinical Biochemistry** 19: 93–96.
- NEVES, D. P.; MELO, A. L.; LINARDI, P. M.; VITOR, R. W. A. **Parasitologia Humana** 12<sup>a</sup> ed. São Paulo: Atheneu, 2011.
- NKHOMA, S.; MOLYNEUX, M.; WARD, S. 2007. *In vitro* antimalarial susceptibility profile and PRCRT/PFMDR-1 genotypes of *Plasmodium falciparum* field isolates from Malawi. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.**, 76: 1107-1112

- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. 2007. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products** 70: 461-477.
- NOEDL, H.; WERNSDORFER, W. H.; KOLLARITSCH, H.; LOOAREESUWAN, S.; MILLER, R. S.; WONGSRICHANALAI, C. 2003. Malaria drug-susceptibility testing. HRP2-based assays: current data, future perspectives. **Wien Klin Wochenschr.** 115(3): 23-27.
- NOGUEIRA, F.; ROSÁRIO, V. E. do. 2010. Métodos para avaliação da atividade antimalárica nas diferentes fases do ciclo de vida do *Plasmodium*. **Revista Pan-Amazônica de Saúde** 1(3): 109-124
- OLIVEIRA, A. M. G. C. Avaliação da atividade antimalárica e citotóxica de plantas medicinais dos Biomas Caatinga e Amazônico. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, RN, Brasil, 2011.
- OLLIARO, P. & YUTHAVONG, Y. 1999. An overview of chemotherapeutic targets for antimalarial drug discovery. **Pharmacology & therapeutics** 81: 91-110.
- OMODEO-SALE, M. F.; MOTTI, A.; BASILICO, N.; PARAPINI, S.; OLLIARO, P. 2003. Accelerated senescence of human erythrocytes cultured with *Plasmodium falciparum*. **Blood** 102: 705-711.
- O'NEILL, P. M.; BRAY, P. G.; HAWLEY, S. R.; WARD S. A.; PARK B. K. 1998. 4-Aminoquinolines-past, present, and future: a chemical perspective. **Pharmacology & therapeutics** 77(1): 29-58.
- ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD. Informe de la situación de los programas de malaria en las Américas (Baseado en datos de 2000). OPS/HCP/HCT/M/189/01. Washington DC, 2001.
- PANNALA, A. S.; CHAN, T. S.; O'BRIEN, P.J.; RICE-EVANS, C. A. 2001. Flavonoids B-ring chemistry and antioxidant activity: fast reaction kinetics. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 282: 1161-1168.
- PARAPINI, S.; BASILICO, N.; PASINI, E.; EGAN, T. J.; OLLIARO, P.; TARAMELLI, D.; MONTI, D 2000. Standardization of the physicochemical parameters to assess *in vitro* the beta-hematin inhibitory activity of antimalarial drugs. **Experimental Parasitology** 96: 249-256.
- PENNINGTON, T.; LIMA, H. C. 1995. Two new species of *Andira* (Leguminosae) from Brazil and the influence of dispersal in determining their distributions. **Kew Bull** 50: 557-566.
- PERCÁRIO, S.; MOREIRA, D. R.; GOMES, B. A. Q.; FERREIRA, M. E. S.; GONÇALVES, A. C. M.; LAURINDO, P. S. O. C.; VILHENA, T. C.; DOLABELA, M. F.; GREEN, M. D. 2012. Oxidative Stress in Malaria. **International Journal of Molecular Sciences** 13: 16346-16372.



- PETERS, W. The chemotherapy of rodent malaria: XXII. 1975. The value of drug-resistant strains of *P. berghei* in screening for blood schizontocidal activity. **Annals of tropical medicine and parasitology** 69(2): 155-71.
- PETRY, R. D.; ORTEGA, G. G.; SILVA, W. B. 2001. Flavonoid content assay: influence of the reagent concentration and reaction time on the spectrophotometric behavior of the aluminium chloride- flavonoid complex. **Pharmazie** 56(6): 465-470.
- PHILLIPS, R. S. 2001. Current status of malaria and potencial for control. **Clinical Microbiology Reviews** 14 (1): 208-226.
- PHILLIPS, R. S.; BRANNAN, L. R.; BALMER, P.; NEUVILLE, P. 1997. Antigenic variation during malaria infection: the contribution from the murine parasite *Plasmodium chabaudi*. **Parasite Immunology** 19(9): 427-434.
- PIETTA, P. G. 2000. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products** 63(7): 1035-42.
- POSTMA, N. S.; MOMMERS, E. C.; ELING, W. M. C.; ZUIDEMA, J. 1996. Oxidative stress in malaria: implications for prevention and therapy. **Pharmacy World and Science** 18: 121-129.
- PÓVOA, M. M.; SILVA, A. N. M.; SANTOS, C. C. B.; SEGURA, M. N. O.; MACHADO, R. L. D. 2000. Malaria transmission. **Ciência e Cultura** 52: 208-212.
- RAJBAPOOR, B.; BURKAN, Z. E.; SENTHILKUMAR, R. 2010. Oxidants and human diseases: role of antioxidant medicinal plants – a review. **Pharmacologyonline** 1: 1117- 1131.
- RAJKUMAR, V.; GUHA, G.; KUMAR, R. A.; MATHEW, L. 2010. Evaluation of antioxidant activities of *Bergenia ciliata* rhizome. **Records of Natural Products** 4: 38-48.
- RAJIC, Z.; KONCIC, M. Z.; MILOLOZA, K.; PERKOVIC, I.; BUTULA, I.; BUCAR, F.; ZORC, B. 2010. Primaquine-NSAID twin drugs: Synthesis, radical scavenging, antioxidant and Fe<sup>2+</sup> chelating activity. **Acta Pharmaceutica** 60: 325-337.
- RAMOS, A.; VISOZO, A., PILOTO, J.; GARCIA, A.; RODRIGUEZ, C. A.; RIVERO, R. 2003. Screening of antimutagenicity via antioxidant activity in Cuban medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology** 87: 241-246.
- RAVISHANKARA, M. N.; SHRIVASTAVA, N.; PADH, H.; RAJANI, M. 2002. Evaluation of antioxidant properties of root bark of *Hemidesmus indicus* R. Br. (Anantmul). **Phytomedicine** 9: 153-160.
- RE, R. PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine** 26(9-10): 1231-1237.
- REIS, P. A.; COMIM, C. M.; HERMANI, F.; SILVA, B.; BARICHELLO, T.; PORTELLA, A. C.; GOMEZ, F. C. A.; SAB, I. M.; FRUTUOSO, V. S.; OLIVEIRA, M. F.; BOZZA, P. T.; BOZZA, F. A.; DAL-PIZZOL, F.; ZIMMERMAN GA, QUEVEDO, J.; CASTRO-FARIANETO, H. C. 2010. Cognitive dysfunction is sustained after rescue therapy in experimental



cerebral malaria, and is reduced by additive antioxidant therapy. **PLoS Pathog** 6(6): e1000963.

- REY, L. (2001) Parasitologia. Editora Guanabara Koogan S. A. Rio de Janeiro, R. J., Brasil.
- RIECKMANN, K. H.; CAMPBELL, G. H.; SAX, L. J.; MREMA, J. E. 1978. Drug sensitivity of *Plasmodium falciparum*: an *in-vitro* microtechnique. **Lancet** 1(8054):22-3.
- RIMBACH, G.; BOESCH-SAADATMANDI, C.; FRANK, J.; FUCHS, D.; WENZEL, U.; DANIEL, H.; HALL, W. L.; WEINBERG, P. D. 2008. Dietary isoflavones in the prevention of cardiovascular disease – A molecular perspective. **Food and Chemical Toxicology** 46: 1308–1319.
- RIDLEY, R. G. 2002. Medical need, scientific opportunity and the drive for antimalarial drugs. **Nature** (insight review articles) 415: 686-692.
- RODRIGUES, J. R.; GAMBOA, N. D. 2009. Effect of dequalinium on the oxidative stress in *Plasmodium berghei*-infected erythrocytes. **Parasitology Research** 104:1491–1496.
- ROGINSKY, V.; LISSI, E. A. 2005. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry** 92: 235-254.
- ROSENTHAL, P. J.; MILLER, L. H. 2001. The need for new approaches to antimalarial chemotherapy. In: Antimalarial Chemotherapy, Mechanism of action resistance, and new directions in drug discovery. **Human Press** 3-13.
- RUSAK, G; KUSTRAK, D.; MALES, Z.; PLESE, N. 1993. The determination of the content of polyphenols in the aerial parts of the species *Centaurea rupestris* L. and *C. fritschii* Hayek (Asteraceae). **Acta Pharmaceutica**, 43: 121-125.
- RUIZ, L.; RUIZ, L.; MACO, M.; COBOS, M.; GUTIERREZ-CHOQUEVILCA, A-L, ROUMY, V. 2011. Plants used by native Amazonian groups from the Nanay River (Peru) for the treatment of malaria. **Journal of Ethnopharmacology** 133: 917–921.
- SALEM, M. M. & WERBOVETZ, K. A. 2006. Isoflavonoids and Other Compounds from *Psoralea argyrea* with Antiprotozoal Activities. **Journal of Natural Products** 69: 43-49.
- SAMPAIO, I. B. M. Estatística aplicada à experimentação animal. 3ª edição / Reimpressão – Belo Horizonte: Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2010. 264P. ISBN: 85-87144-07-3
- SANTOS, L. C.; PIACENTE, S.; MONTORO, P.; PIZZA, C.; VILEGAS, W. 2003. Atividade antioxidante de xantonas isoladas de espécies de *Leiothrix* (Eriocaulaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia** 13( 2): 67-74.
- SHU, X. O.; JIN, F.; DAI, Q.; WEN, W.; POTTER, J. D.; KUSHI, L.H.; RUAN, Z.; GAO, Y. T.; ZHENG, W. 2001. Soyfood intake during adolescence and subsequent risk of breast cancer among Chinese women. **Cancer Epidemiology Biomarkers Prevention** 10, 483-488.

- SAXENA, S.; PANT, N.; JAIN, D. C.; BHAKUNI, R. S. 2003. Antimalarial agents from plant sources. **Current Science** 85(9):1314-1329.
- SILVA, B. P.; VELOZO, L.S.M., PARENTE, J.P. 2000. Biochanin A triglycoside from *Andira inermis*. **Fitoterapia** 71: 663-667.
- SILVA, L. D. Efeito da Suplementação com Antioxidantes Sobre as Alterações Oxidativas e Produção de Interferon Gamma e Fator de Necrose Tumoral Alfa em Tecido Pulmonar de Camundongos Infectados por *Plasmodium Berghei*. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Pará, Belém, PA, Brasil, Novembro 2011.
- SILVA, V. C. da; CARVALHO, M. G. de; BORBA, H. R.; SILVA, S. L. C. 2008. Atividade anti-helmíntica dos flavonóides isolados das raízes de *Andira anthelmia* (Leguminosae). **Revista Brasileira de Farmacognosia** 18(4): 573-576.
- SILVA, T. H. A.; OLIVEIRA, M. T.; SANTOS, H. F.; OLIVEIRA, A. B.; ALMEIDA, W. B. 2005. Estudo de modelagem molecular de complexos ferriprotoporfirina-IX e quinolinocarbinoliaminas antimaláricas: proposta de um farmacóforo. **Química Nova** 28 (2): 244-249.
- SILVA, S. L. C.; BORBA, H. R.; BONFIM, R. C. B.; CARVALHO, M. G.; CAVALCANTI, H. L.; BARBOSA, C. G. 2003. Ação Anti-helmíntica de extratos brutos de *Andira anthelmia* (Vell.) Macbr. e *Andira fraxinifolia* Benth., em camundongos naturalmente infectados por *Vampirolepis nana* e *Aspiculuris tetraptera*. **Parasitología Latinoamericana** 58: 23-29.
- SILVA, V. C. da; ALVES, A. N.; SANTANA, A. de; CARVALHO, M. G. de; CUNHA, S. L. da e SILVA; J. S. 2006. Constituintes fenólicos e terpenóides isolados das raízes de *Andira fraxinifolia* (Fabaceae). **Química Nova** 29(6): 1184-1186.
- SOARES, S. E. 2002. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição** 15(1): 71-81.
- SOBRATTEE, M. A.; NEERGHEEN, V. S.; LUXIMON-RAMMA, A., ARUOMA, O. I.; BAHORUN, T. 2005. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. **Mutation Research** 579: 200–213.
- SRIVASTAVA, I. K.; VAIDYA, A. B. 1999. A mechanism for the synergistic antimalarial action of atovaquone and proguanil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 43: 1334-1339.
- SULLIVAN, D. J. 2002. Theories on malarial pigment formation and quinoline action. **International Journal of Parasitology** 32: 1645-1653.
- TANG, S. Y.; WHITEMAN, M.; PENG, Z. F.; JENNER, A.; YONG, E. L.; HALLIWELL, B. 2004. Characterization of antioxidant and antiglycation properties and isolation of active ingredients from traditional chinese medicines. **Free Radical Biology and Medicine** 36(12): 1575-87.
- TAIUL, P. L.; SILVA, A. R.; TOSTA, C. E. 2007. Controle da Malária no Brasil: Situação atual, desafios e perspectivas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 40 (Supl II): 8-16.

- TAUIL, P. L. 2006. Perspectives of vector borne diseases control in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 39 (3): 275-277
- TALISUNA, A. O.; BLOLAND, P.; D'ALESSANDRO, U. 2004. History, dynamics, and public health importance of malaria parasite resistance. **Clinical Microbiology Reviews** 17(1): 235-54.
- TANOS, C. C. et al. 2004. A Complete Model of the *Plasmodium falciparum* Bifunctional Enzyme Dihydrofolate Reductase-Thymidylate Synthase. A Model to Design New Antimalarials. **Journal of the Brazilian Chemical Society** 15(3): 450-454.
- TIUMAN, T. S.; UEDA-NAKAMURA, T.; CORTEZ, D. A. G.; DIAS FILHO, B. P.; MORGADO DÍAZ, J. A.; SOUZA, W.; NAKAMURA, C. V. 2005. Antileishmanial activity of phartenolide, a sesquiterpenic lactone isolated from *Tanacetum parthenium*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 49:176-182.
- TOLER, S. 2005. The plasmodial apicoplast was retained under evolutionary selective pressure to assuage blood stage oxidative stress. **Medical Hypotheses** 65(4): 683-690.
- TRAGER, W.; JENSEN, J. B. 1976. Human malaria parasites in continuous culture. **Science** 193(4254): 673-675.
- VALE, N.; MOREIRA, R.; GOMES, P. 2005. Quimioterapia da malária – um século no desenvolvimento de antimaláricos. 2005. **Química Nova** 99: 61-73.
- VANGAPANDU, S.; SACHDEVA, S.; JAIN, M.; SINGH, S.; SINGH, P.; KAUL, C. L.; JAIN, R. 2003. 8-Quinolinamines and Their Pro Prodrug Conjugates as Potent Blood-Schizontocidal Antimalarial Agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry** 11: 4557-4568.
- VAN DEN BERG, R.; HAENEN, G. R. M. M.; VAN DEN BERG, H.; BAST, A. 1999. Applicability of an improved TROLOX equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. **Food Chemistry**, 66: 511-517.
- VAN VIANEN, P. H.; VAN ENGEN, A.; THAITHONG, S.; VAN DER KEUR, M.; TANKE, H. J.; van der KAAJ, H. J. 1993. Flow cytometric screening of blood samples for malaria. **Cytometry** 14(3): 276-80.
- VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. F.; MANFREDINE, V.; BENFATO, M. S.; KUBOTA, L. T. 2007. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova** 30(5): 1323-1338.
- VIAL, H. J.; WEIN, S.; FARENC, C.; KOCKEN, C.; NICOLAS, O.; ANCELIN, M. L.; BRESSOLLE, F.; THOMAS, A.; CALAS, M. Prodrugs of bisthiazolium salts are orally potent antimalarials. **Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)** 101(43): 15458-15463.
- VISIOLI, F.; KEANEY-JR, J. F.; HALLIWELL, B. 2000. Antioxidants and cardiovascular disease; panaceas or tonics for tired sheep? **Cardiovascular Research** 47: 409.

- WEI, H.; BOWEN, R.; CAI, Q.; BARNES, S.; WANG, Y. 1995. Antioxidant and antipromotional effects of the soybean isoflavone genistein. **Experimental Biology Medicine** 208: 124–130.
- WELLS, T. N. C. 2011. Natural products as starting points for future anti-malarial therapies: going back to our roots? **Malaria Journal** 10(Suppl 1):S3.
- WETTASINGHE, M.; SHAHIDI, F. 1999. Evening primrose meal: a source of natural antioxidants and scavenger of hydrogen peroxide and oxygen-derived free radicals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 47: 1801-1812.
- WHITE, N. J. 2004. Antimalarial drug resistance. **Journal of Clinical Investigation** 113: 1084-1092.
- WILLCOX, M. L.; BODEKER, G. 2000. Plant-based malaria control: research initiative on traditional antimalarial methods. **Parasitology Today** 16: 220-221.
- WILLCOX, M. L.; BODEKER, G. 2004. Traditional herbal medicines for malária. **British Medical Journal** 329:1156–1159.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION.** 2009. [www.who.int](http://www.who.int) – Acesso em 10/12/2011.
- WORLD HEATH ORGANIZATION.** Relatório Global da Malária. 2012. Disponível em [http://www.who.int/malaria/publications/world\\_malaria\\_report\\_2012/wmr2012\\_full\\_report.pdf](http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2012/wmr2012_full_report.pdf)
- WORLD HEALTH ORGANIZATION.** 2013. [www.who.int](http://www.who.int) – Acesso em 10/07/2013.
- WRIGHT, C. W. 2005. Traditional antimalarials and the development of novel antimalarial drugs. **Journal of Ethnopharmacology** 100: 67–71.
- YENESEWA, A.; AKALAB, H. M.; TWINOMUHWENZIA, H.; CHEPKIRUIA, C.; IRUNGUE, B. N.; EYASEB, F. L.; KAMATENESI-MUGISHAC, M.; KIREMIRE, B. T.; JOHNSON, J. D.; WATERS, N. C. 2012. The antiplasmodial and radical scavenging activities of flavonoids of *Erythrina burttii*. **Acta Tropica** 123: 123-127.
- YEKA, A.; BANEK, K.; BAKYAITA, N.; STAEDKE, S. G.; KAMYA, M. R.; TALISUNA, A.; KIRONDE, F.; NSOBYA, S. L.; KILIAN, A.; SLATER, M.; REINGOLD, A.; ROSENTHAL, P. J.; WABWIRE-MANGEN, F.; DORSEY, G. 2005. Artemisinin versus nonartemisinin combination therapy for uncomplicated malaria: randomized clinical trials from four sites in Uganda. **PLoS Med.** 2 (7): 654-662.
- ZIELINSKI, H.; KOZLOWSKA, H. 2000. Antioxidant activity and total phenolics in selected cereal grains and their different morphological fractions. **Journal of Agricultural And Food Chemistry**, 48 ( 6): 2008-2016.
- ZIGLER, J.; LINCK, R.; WRIGHT, D. W. 2001. Heme Aggregation Inhibitors: Antimalarial Drugs Targeting an Essential Biomineralization Process. **Current Medicinal Chemistry** 8: 171-189.

ZIEGLER, H. L.; HANSEN, H. S.; STAERK, D.; CHRISTENSEN, S. B.; HAGERSTR, H.; JAROSZEWSKI, J. W. 2004. The antiparasitic compound licochalcone A is a potent echinocytogenic agent that modifies the erythrocyte membrane in the concentration range where antiplasmodial activity is observed. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 48: 4067-4071.

ZOFOU, D.; KOWA, T. K.; WABO, H. K., NGEMENYA, M. N.; TANE, P. & TITANJI, V. P. K. 2011. *Hypericum lanceolatum* (Hypericaceae) as a potential source of new anti-malarial agents: a bioassay-guided fractionation of the stem bark. **Malaria Journal** 10:167.