



UNIVERSIDADE FEDERAL DE RORAIMA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS NATURAIS

MARLENE RODRIGUES MARCELINO CAMARGO

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMALÁRICA E ANTIMICROBIANA DE
Geissospermum argenteum Woodson E *Minquartia guianensis* Aubl COLETADAS
EM RORAIMA

Boa Vista
2011

MARLENE RODRIGUES MARCELINO CAMARGO

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMALÁRICA E ANTIMICROBIANA DE
Geissospermum argenteum Woodson E *Minuartia guianensis* Aubl COLETADAS
EM RORAIMA

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Recursos Naturais da Universidade Federal de Roraima.

Orientador: Prof. Dr. Adrian Martin Pohlit

Co-orientador: Prof. Dr. Marcos José Salgado Vital

Boa Vista

2011

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal de Roraima

C172a Camargo, Marlene Rodrigues Marcelino.

Avaliação da atividade antimalárica e antimicrobiana de *Geissospermum argenteum* Woodson E *Minuartia guianensis* Aubl coletadas em Roraima/ Marlene Rodrigues Marcelino. - Boa Vista, 2012.

96p. : il.

Orientador: Prof. Dr. Adrian Martin Pohlit.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Roraima, Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais.

1 – Antibacterial. 2 – Antifungal. 3 – *Plasmodium falciparum*. *Staphylococcus aureus* . 4 – *Streptococcus mutans*. 5 – *Candida albicans*. I – Título. II – Pohlit, Adrian Martin. (orientador)

CDU – 615.1(811.4)

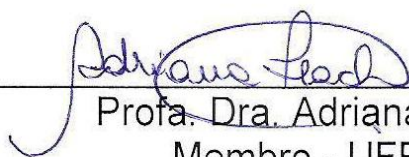
MARLENE RODRIGUES MARCELINO CAMARGO

Avaliação da Atividade Antimalárica e Antimicrobiana de *Geissospermum argenteum* Woodson e *Minuartia guianensis* Aubl, coletadas em Roraima.

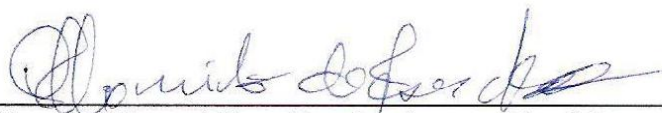
Dissertação apresentada como pré-requisito para conclusão do Curso de Mestrado em Recursos Naturais da Universidade Federal de Roraima, defendida em 26 de outubro de 2011 e avaliada pela seguinte Banca Examinadora:



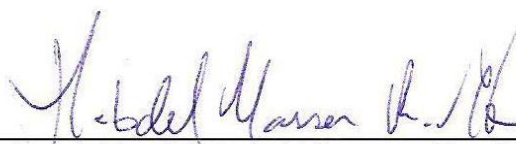
Prof. Dr. Adrian Martin Pohlit
Orientador - INPA



Profa. Dra. Adriana Flach
Membro - UFRR



Profa. Dra. Albanita de Jesus Rodrigues da Silva
Membro - UFRR



Prof. Dr. Habel Nasser Rocha da Costa
Membro - UFRR

Dedico este trabalho a Deus, ao meu marido, Calvino, que com sabedoria me apoiou e às minhas filhas adoráveis, Mariana e Ana Beatriz, que sempre estiveram ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus acima de tudo, pois sem Ele nada seria possível;

A minha família por todo apoio, incentivo e paciência com as minhas ausências;

Ao senhor Atanael e família por permitirem que as coletas fossem realizadas em sua propriedade;

Ao professor Dr. Adrian M. Pohlit, meu orientador, pelas aulas de química orgânica, orientações, conversas informais, pela amizade, e pela sua imensa contribuição para minha formação como profissional e pesquisadora;

Ao Dr. Rodrigo Amorim pela valiosa orientação no Laboratório de Princípios Ativos da Amazônia (LAPAAM);

Ao Msc. Luiz Francisco Rocha que tão bem me recebeu e ensinou a cultivar o Plasmodium no laboratório da Gerência de Malária do Hospital da Fundação de Medicina Tropical – Manaus (FMT – AM);

A Dra. Ana Lúcia Carneiro da Universidade Federal do Amazonas, pelas orientações em microbiologia;

Ao professor Dr. Marcos J. S. Vital pelo apoio e colaboração;

A professora Albanita de Jesus R. da Silva pela colaboração, ao possibilitar o uso do Laboratório de Substâncias Ativas do CCBio e também pela amizade;

Ao Marcus Vinicius, Márcia e Mariana pela colaboração nas coletas;

Ao David, bolsista do laboratório de Gerência de Malária do Hospital da Fundação de Medicina Tropical – Manaus (FMT – AM), pelo precioso auxílio e amizade;

Aos mestrandos e bolsistas de graduação do LAPAAM, que me ensinaram a rotina do laboratório e me acolheram com carinho;

Ao Vadeílson, Gisele, Jonathan, Júlia e David por me receberam em seu lar com muito carinho e amizade.

Ao Luiz Francisco, Djane, Daniel e Joãozinho, por me acolherem e pela grande amizade;

Ao sr. Luiz, Elaine e Luane pelo acolhimento e amizade.

Aos amigos do Lapaam: Andreza, Tiago, Andréia, Ellen, Banny, Rita Cinara, Magno, Patricia e Kethleen;

A Marycleuma e Suniá pelas orientações, aulas de químicas e amizade;

Aos grandes amigos da turma 2009 do Mestrado em Recursos Naturais: Márcia, Ilzo, Karen, Luciano Ramão, Carlos, Tiago, James, Raimundo e Paula, pelo companheirismo e amizade;

Aos professores do Pronat pelas aulas e orientações;

Ao professor Rodrigo e Luiz Fernando por possibilitar que o estágio docente ocorresse no curso de Ciências Biológicas da UERR;

À Ângela, bibliotecária, pelo apoio;

A PRPPG pelo apoio financeiro (viagens à Manaus);

Ao CNPQ pelo apoio financeiro.

“Parece paradoxal que, em tempos em que a medicina científica moderna avança com passos tão gigantes e goza de prestígio inigualável, tratamentos tradicionais continuem despertando muito interesse tanto em países desenvolvidos quanto em países em desenvolvimento.”

Bannerman (1982)

RESUMO

Dentre as espécies florestais nativas da Amazônia utilizadas por populações tradicionais na terapêutica de diversos problemas de saúde estão a *Geissospermum argenteum* Woodson, uma Apocynaceae, e a *Minquartia guianensis* Aubl., da família Olacaceae. Entre os problemas de saúde está a malária, que no Brasil e no mundo ainda é um grave problema de saúde pública. Outro agravo à saúde de importância são infecções microbianas, pois os micro-organismos têm desenvolvido resistência aos agentes antimicrobianos. Neste trabalho, foram coletadas amostras de cascas, folhas e galhos de *G. argenteum* e *M. guianensis*, em área de floresta, na Vila Apiaú, município de Mucajaí – RR. As amostras foram submetidas à extração metanólica a quente e extração aquosa. Amostra de extrato metanólico de cascas de *G. argenteum* foi submetida a particionamento líquido-líquido, resultando nas frações hexânica, clorofórmica, acetato de etila e metanol/água. A fração clorofórmica foi selecionada para cromatografia em coluna com sistema gradiente de solventes, obtendo-se 38 frações, as quais foram analisadas através de CCD e destas a fração Cr10 foi selecionada para cromatografia preparativa, a partir da qual foi obtida a fração F6, que analisada em CCD mostrou-se positiva para alcalóides. Os extratos metanólicos e aquosos de ambas as espécies, e frações primárias provenientes de extratos *G. argenteum* foram testados em ensaios *in vitro* para atividade antimalárica frente à cepa cloroquino-resistente, K1, de *Plasmodium falciparum*, nas concentrações de 50 e 5 µg/mL. Posteriormente, amostras ativas foram avaliadas em 7 diluições para estabelecer a relação dose-resposta e valores de concentração inibitória mediana (CI₅₀). Amostras provenientes das duas espécies também foram testadas contra as cepas bacterianas, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* e *Escherichia coli*, e contra a levedura *Candida albicans*. A atividade antimicrobiana foi avaliada através de difusão em ágar e a concentração inibitória mínima (CIM) por microdiluição em placas. Para as frações acetato de etila, clorofórmica, hexânica e hidroalcoólica obtida de cascas de *G. argenteum* e a fração Cr10 foi realizada a bioautografia para *S. aureus*. Na atividade antimalárica o extrato metanólico de casca foi ativo, com CI₅₀ de 4,6 µg/mL e a fração clorofórmica obtida de casca de *G. argenteum* também foi ativa com CI₅₀ de 2,0 µg/mL. Os extratos de *M. guianensis* foram considerados inativos para a atividade antimalárica. Na atividade antimicrobiana, através de difusão em ágar, extratos de *G. argenteum* foram parcialmente ativos contra *S. aureus*, *S. mutans* e inativos contra *E. coli* e *C. albicans*. A CIM para *S. aureus* foi de 0,63 mg/mL para a fração metanol/água, para *S. mutans*, CIM de 0,63 mg/mL e *C. albicans* com CIM de 0,63 mg/mL. Para cepa de *E. coli* os extratos foram inativos. Extratos de *M. guianensis* mostraram-se ativos frente à *S. aureus* e *C. albicans* através de difusão em ágar e apresentaram a CIM superior a 1mg/ml para *S. aureus*, *S. mutans* e *C. albicans*. Os extratos de *M. guianensis* foram inativos contra *E. coli*. Na bioautografia para *S. aureus* as frações testadas apresentaram atividade.

Palavras-chave: Antibacteriana. Antifúngica. *Plasmodium falciparum*.
Staphylococcus aureus. *Streptococcus mutans*. *Candida albicans*.

ABSTRACT

Among the natives species from the Amazon Forest used by traditional populations in the treatment of various health problems, including, malaria, which in Brazil and in the world remains a serious public health problem, are *Geissospermum argenteum* Woodson, an Apocynaceae, and *Minquartia guianensis* Aubl, Olacaceae family. Another important health problem is the microbial infections, because the microorganisms have developed resistance to antimicrobial agents. In this work, samples were collected from bark, leaves and twigs of *G.argenteum* and *M. guianensis* in a forestall area in Apiaú village, city of Mucajaí – RR. The samples were extracted by hot methanol and water extraction, resulting in methanol and aqueous extracts. Sample of methanol extract of bark of *G.argenteum* was submitted to liquid-liquid partitioning, resulting in fractions hexane, chloroform, ethyl acetate and methanol/water. The chloroform fraction was selected for fractionation using chromatography column and solvent gradient system, resulting in 38 fractions, which were analyzed by TLC and the fraction Cr10 was selected for preparative chromatography, from which the fraction F6 was obtained, analyzed in CCD was positive for alkaloids. The methanol and aqueous extracts of both species and fractions of extracts from primary *G.argenteum* were tested *in vitro* assays for antimalarial activity against the chloroquine-resistant K1 *Plasmodium falciparum* at concentrations of 50 and 5 mg/mL. Subsequently, active samples were evaluated in 7 dilutions to establish the dose-response and median inhibitory concentration values (IC₅₀). Samples from two species were also tested against bacterial strains, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* and *Escherichia coli*, and against the yeast *Candida albicans*. Antimicrobial activity was evaluated by agar diffusion and minimum inhibitory concentration (MIC) by microdilution plates. For fractions of ethyl acetate, chloroform, hexane and water-alcohol obtained from barks of *G.argenteum*, fraction Cr10 and bioautography was performed for *S. aureus*. Antimalarial activity in the methanol extract of bark was active, with IC₅₀ of 4,6 mg/mL and chloroform fraction obtained from bark of *G.argenteum* was also active with IC₅₀ of 2,0 mg/mL. The extracts of *M. guianensis* were considered inactive for antimalarial activity. In antimicrobial activity by agar diffusion, extracts of *G.argenteum* were partially active against *S. aureus*, *S. mutans* and inactive against *E. coli* and *C. albicans*. The MIC for *S. aureus* was 0,63 mg/mL per fraction methanol/water, *S. mutans*, MIC of 0,63 mg/mL and *C. albicans* with an MIC of 0,63 mg/mL. For the strain of *E.coli* there was no activity. Extracts of *M. guianensis* were active against the *S. aureus* and *C. albicans* by agar diffusion and presented more than 1 mg/mL MIC for *S aureus*, *S.mutans* and *C. albicans*. The extracts of *M. guianensis* were inactive against *E. coli*.

Keywords: Antibacterial. Antifungal. *Plasmodium falciparum*. *Staphylococcus aureus*. *Streptococcus mutans*. *Candida albicans*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Distribuição da família Apocynaceae Juss. no mundo	20
Figura 2	- Alstonina	28
Figura 3	- Distribuição da família Olacaceae R. Br. no mundo	32
Figura 4	- Ciclo do <i>Plasmodium</i>	38
Figura 5	- Estado de Roraima com a localização de município de Mucajaí (vermelho) e neste os dois pontos de coleta (1 e 2)	42
Figura 6	- <i>M. guianensis</i> . a) visão geral; e b) tronco sulcado	43
Figura 7	- Localização de <i>M. guianensis</i> (árvore na qual foi realizada a coleta)	44
Figura 8	- Exsicata de <i>M. guianensis</i> depositada no herbário do INPA	44
Figura 9	- Indivíduo no qual foi realizada a coleta a) aspecto geral; b) ramo com frutos; c) parte do tronco	45
Figura 10	- Localização do indivíduo de <i>G. argenteum</i>	46
Figura 11	- Exsicata de <i>G. argenteum</i>	46
Figura 12	- Estufa com circulação e renovação de ar (a); secagem das amostras em estufa de circulação de ar (b)	47
Figura 13	- Moinho de facas (a); serragem após moagem (b)	48
Figura 14	- Fluxograma das extrações metanólicas (processo repetido para cascas, folhas e galhos de <i>M. guianensis</i> e <i>G. argenteum</i>)	50
Figura 15	- Conjunto de aparelhos Soxhlet do LAPAAM (a); extração em andamento (b)	51
Figura 16	- Evaporador rotativo utilizado na concentração dos extratos	51
Figura 17	- Fluxograma da infusão para cascas, folhas e galhos de <i>M. guianensis</i> e <i>G. argenteum</i>	52
Figura 18	- CCDs de extratos brutos metanólicos de folhas (F), galhos (G) e cascas (C) revelados com Dragendorff (a), UV 366 (b), UV254 (c)	54
Figura 19	- Partição líquido-líquido: a - fases metanol/água e clorofórmio; b - fase clorofórmica recolhida em balão; c - fases hidroalcoólica e acetato de etila em funil de separação	55
Figura 20	- Fluxograma da partição líquido-líquido do extrato metanólico das cascas de <i>G. argenteum</i>	56
Figura 21	- CCD das frações clorofórmica (C), Acetato de etila (A) e hidroalcoólica (M) reveladas com Dragendorff e eluídas com CHCl ₃ : Acetona: Et ₂ NH (5:4:1)	57
Figura 22	- Preparo da sílica impregnada com amostra para a coluna cromatográfica	58
Figura 23	- Coluna cromatográfica (a – disposição do extrato na coluna; b – visão geral da coluna gradiente)	59
Figura 24	- Fração 10 da coluna cromatográfica revelada com vapor de iodo e Dragendorff, respectivamente	61
Figura 25	- Cromatografia preparativa revelada em UV 254 nm. Faixas observadas: F ₁ , F ₂ , F ₃ , F ₄ , F ₅ , F ₆ e F ₇	62
Figura 26	- Placa de CCD preparativa da fração Cr10 revelada com Dragendorff	62
Figura 27	- F ₆ revelada com vapor de iodo	63
Figura 28	- Esfregaço sanguíneo corado	65
Figura 29	- Teste antimalárico <i>in vitro</i>	66

Figura 30	-	Cuba com 3% de O ₂ , 5% de CO ₂ e 92% de N ₂	67
Figura 31	-	Preparo das lâminas do teste antimalárico <i>in vitro</i> (a). Extensões sanguíneas antes da coloração (b)	67
Figura 32	-	Teste antimicrobiano através de difusão com perfuração do ágar .	70
Figura 33	-	Conversão do resazurin a resorufin	72
Figura 34	-	CIM através de microdiluição em placa (a – placa antes da incubação; b – Após o tempo de incubação)	72
Figura 35	-	Fração F6 positiva para alcalóides (Dragendorff positivo)	77
Figura 36	-	Curva dose-resposta do extrato ativo	78
Figura 37	-	Extratos inativos (13 e 14) e controle negativo (DMSO) sem halo de inibição	80
Figura 38	-	Bioautografia para <i>S. aureus</i> mostrando zona de inibição de crescimento bacteriano (a); cromatoplaça de referência indicando a fração Cr 10 positiva para alcalóides (b)	83
Figura 39	-	Ação de extratos de <i>M. guianensis</i> em cepa de <i>S. aureus</i>	86
Figura 40	-	CIM através de microdiluição para <i>C. albicans</i> (cor azul indica inibição celular e cor rosa indica proliferação celular)	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Alcalóides encontrados de <i>Geissospermum</i> spp.	24
Tabela 2	- Substâncias encontradas em <i>M. guianensis</i>	34
Tabela 3	- Massa das amostras de <i>G. argenteum</i> da coleta, após secagem e depois da moagem	48
Tabela 4	- Massa das amostras de <i>M. guianensis</i> da coleta, após secagem e depois da moagem	49
Tabela 5	- Frações obtidas por particionamento de 10,4 g de extrato metanólico de casca de <i>G. argenteum</i>	55
Tabela 6	- Sistema de eluentes utilizados na coluna cromatográfica gradiente	58
Tabela 7	- Frações obtidas da fração clorofórmica (1,19 g) através de fracionamento cromatográfico em coluna	60
Tabela 8	- Massas das frações obtidas através de CCD – P	63
Tabela 9	- Teor extrativo da extração metanólica e aquosa de <i>G. argenteum</i>	76
Tabela 10	- Atividade antimalárica de extratos e frações de <i>G. argenteum</i>	79
Tabela 11	- Halos de inibição microbiana.....	81
Tabela 12	- CIM através do método da microdiluição	82
Tabela 13	- Teor extrativo da extração metanólica e aquosa de <i>M. guianensis</i>	84
Tabela 14	- Atividade antimalárica de extratos <i>M. guianensis</i>	85
Tabela 15	- Atividade antimicrobiana através de difusão em ágar	87
Tabela 16	- CIM através do método da microdiluição	88

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

a.C.	Antes de Cristo
AcOEt	Acetato de etila
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CBAM	Coleção de bactérias da Amazônia
CCBio	Centro de Ciências Biológicas
CCD	Cromatografia em camada delgada
CCD - P	Cromatografia em camada delgada preparativa
CHCl ₃	Clorofórmio
Cl ₅₀	Concentração de inibidor necessária para inibir 50% de um parâmetro
CIM	Concentração inibitória mínima
CO ₂	Dióxido de carbono
DCM	Diclorometano
DMSO	Dimetilssulfóxido
DNA	Acido desoxirribonucleico
Eq	Esquizonte
Et ₂ NH	Dietilamina
EtOH	Etanol
FTM – AM	Fundação de Medicina Tropical do Amazonas
g	Grama
GPS	<i>Global Position System</i>
h	Hora
h	Altura
H ₂ O	Água
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HNP	Hemácia não parasitada
INPA	Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia
K1	Cepa cloroquina resistente
kg	Quilograma
L	Litro
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente
LAPAAM	Laboratório de Princípios Ativos da Amazônia
m	Metro
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milimetro
N	North (norte)
N ₂	Nitrogênio
An	Anel
NaCl	Cloreto de sódio
NH ₄ OH	Hidróxido de amônia
nm	Nanômetro
Ø	Diâmetro
O ₂	Oxigênio
PSA	<i>Prostate Specific Antigen</i> ou Antígeno Prostático Especifico
R	Radical

RMN ¹³ C	Ressonância magnética nuclear do carbono 13
RMN ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RPMI	Institute Roswell Park Memorial
s	Segundo
SISBIO	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
SIVEP	Sistema de Informações de Vigilância Epidemiológica
spp.	Espécies
SUS	Sistema Único de Saúde
Tf	Trofozoíto
TTC	2,3,5 - triphenyltetrazolium chloride (2,3,5 – cloreto de trifeniltetrazólio)
UFAM	Universidade Federal do Amazonas
UFRR	Universidade Federal de Roraima
UV	Ultra Violeta
W	West (oeste)
WHO	World Health Organization
XIX	Século dezenove
%	Porcentagem
° C	Graus Celsius
µg	Micrograma
5 HT _{1A}	5 - hidroxitriptamina (1A)

SUMÁRIO

	RESUMO	
	ABSTRACT	
	LISTA DE FIGURAS	
	LISTA DE TABELAS	
	LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	
1	INTRODUÇÃO	15
1.1	DIVERSIDADE VEGETAL NO BRASIL E PLANTAS MEDICINAIS....	16
1.2	METABOLISMO VEGETAL	17
1.3	ESPÉCIES NATIVAS ESTUDADAS	19
1.3.1	Aspectos botânicos da família Apocynaceae Juss.	19
1.3.1.1	Aspectos botânicos do gênero <i>Geissospermum</i> Allemão	20
1.3.1.2	Aspectos botânicos de <i>Geissospermum argenteum</i> Woodson	21
1.3.1.3	Aspectos químicos de <i>Geissospermum</i> spp.	21
1.3.1.4	Aspectos etnobotânicos e etnofarmacológicos de <i>Geissospermum</i> spp.	27
1.3.2	Aspectos botânicos da família Olacaceae R. Br	32
1.3.2.1	Aspectos botânicos de <i>Minquartia guianensis</i> Aubl.	32
1.3.2.2	Aspectos químicos de <i>M. guianensis</i> Aubl.	35
1.3.2.3	Aspectos etnobotânicos e etnofarmacológicos de <i>M. guianensis</i>	35
1.4	Aspectos gerais da Malária	36
1.4.1	Generalidades do parasita	37
1.4.2	Aspectos epidemiológicos da malária no Brasil e em Roraima ...	38
1.4.3	Controle da malária	39
2	OBJETIVOS	41
2.1	OBJETIVO GERAL	41
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
3	MATERIAL E MÉTODOS	42
3.1	ÁREA DE COLETA	42
3.2	COLETA E IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA DE <i>Minquartia guianensis</i> AUBL	43
3.3	COLETA E IDENTIFICAÇÃO DE <i>G. argenteum</i> WOODSON	45
3.4	COLETA E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS	47
3.5	EXTRAÇÃO	49
3.5.1	Preparação do extrato metanólico	49
3.5.2	Preparação do extrato aquoso	52
3.6	PARTIÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DO EXTRATO METANÓLICO DE CASCAS DE <i>G. argenteum</i>	53
3.6.1	Análise das frações de <i>G. argenteum</i> por CCD	55
3.7	FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DA FASE CLOROFÓRMICA	57
3.8	CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA PREPARATIVA NA FRAÇÃO CR10	61
3.9	ENSAIOS BIOLÓGICOS	63
3.9.1	Atividade antimalárica <i>in vitro</i>	64
3.9.1.1	Determinação de CI_{50}	68
3.9.2	Atividade antimicrobiana	69
3.9.2.1	Método da difusão em ágar	69

3.9.2.2	Concentração inibitória mínima (CIM)	71
3.9.2.3	Bioautografia	72
3.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA	73
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	74
4.1	<i>G. argenteum</i>	74
4.1.1	Composição química	75
4.1.2	Atividade antimalárica de extratos <i>G. argenteum</i>	76
4.1.3	Atividade antibacteriana e antifúngica	79
4.2	<i>M. guianensis</i>	82
4.2.1	Atividade antimalárica de extratos <i>M. guianensis</i>	83
4.2.2	Atividade antibacteriana e antifúngica	85
5	CONCLUSÃO	90
	REFERÊNCIAS	91
	ANEXOS	98

1 INTRODUÇÃO

Desde a antiguidade as plantas têm sido um recurso ao alcance do homem para o tratamento de doenças e seus sintomas que o tem afligido no decorrer de sua história. Assim podemos dizer que o uso de plantas medicinais começou com a própria história do homem, através de experiências de ensaio e erro. (DI STASI, 1996). Ao longo do tempo o homem evoluiu, empiricamente, em seu conhecimento sobre o uso das plantas não só na alimentação, mas também para a cura de suas enfermidades e este desenvolvimento veio da necessidade de compreensão da relação entre homem e natureza e o uso desses recursos para o seu próprio benefício (DI STASI, 1996).

Nos dias atuais o uso de plantas medicinais tem se tornado uma prática bastante difundida, uma vez que estudos realizados em diversas partes do mundo têm comprovado cientificamente o que até então fazia parte do saber popular. Considerando a importância do uso medicinal das plantas torna-se necessário realizar pesquisas com a finalidade de determinar a composição química destas, bem como evidenciar novas substâncias e suas atividades biológicas, de acordo com parâmetros científicos, para que a partir destas, novos fármacos, eficazes e seguros sejam sintetizados.

As plantas correspondem a uma das mais ricas fontes de material com atividade medicinal em razão de sua diversidade, por isso têm sido utilizadas como recurso para as preparações tradicionais pelas populações nativas e urbanas. (BRANDÃO et al., 2008). No decorrer dos anos estes conhecimentos, chamados de etnoconhecimentos, têm contribuído para direcionar estudos químicos e farmacológicos, que buscam isolar princípios ativos de plantas utilizadas na medicina popular, dando origem a novos fármacos e fitoterápicos. (BRANDÃO et al., 2008).

Fitoterápico é o:

Medicamento obtido empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. Sua eficácia e segurança é validada através de levantamentos etnofarmacológicos de utilização, documentações técnico-científicas em publicações ou ensaios clínicos fase 3. Não se considera medicamento fitoterápico aquele que, na sua composição, inclua substâncias ativas

isoladas, de qualquer origem, nem as associações destas com extratos vegetais (BRASIL, 2004).

Mesmo com drogas sintéticas disponíveis, muitos sintomas e doenças ainda são tratados com preparações tradicionais, isto é, preparados a partir de plantas, e a malária é uma delas. Entre os medicamentos comerciais para malária a maioria tem relação com produtos naturais, como a quinina e seus derivados e os derivados semi-sintéticos da artemisinina (BOURDY et al., 2008).

Nesse contexto novas pesquisas com plantas são importantes, uma vez que através delas novas substâncias podem ser extraídas, isoladas, modificadas e testadas com o objetivo de encontrar alternativas terapêuticas para as inúmeras enfermidades que atingem o ser humano. Para contribuir com as pesquisas nessa área realizou-se estudo envolvendo *Geissospermum argenteum* Woodson e *Minqartia guianensis* Aubl. das quais foram preparados extratos de folhas, galhos e cascas, os quais foram avaliados quanto à atividade antimalárica e antimicrobiana *in vitro*.

1.1 DIVERSIDADE VEGETAL NO BRASIL E PLANTAS MEDICINAIS

O Brasil é apontado como o país com maior diversidade genética vegetal do mundo, com elevada disponibilidade de recursos naturais, os quais podem ser utilizados de variadas formas pelo homem. Mais da metade das espécies estão nas florestas tropicais e por isso é necessário o desenvolvimento de programas de conservação *in situ* de germoplasma vegetal (GUERRA; NODARI, 2004). A utilização destes recursos naturais deve ocorrer de maneira sustentável evitando assim, exaurir estas fontes.

Recente levantamento aponta novos números de plantas e fungos no Brasil e neste as Angiospermas apresentam 227 famílias, que compreendem 2818 gêneros e 31162 espécies. Segundo o mesmo estudo o domínio morfoclimático da Mata Atlântica apresenta a maior riqueza, com 13972 espécies de Angiospermas. A Amazônia e o Cerrado aparecem em seguida com diversidade semelhante, mas os dados referentes à Amazônia podem estar sub-amostrados, uma vez que a densidade de coleta é baixa e pontual, o que mostra a necessidade de que novos inventários sejam realizados na região (FORZZA, 2010). Já Brito e Brito (1993)

apontam a Amazônia como a região do país com maior diversidade em plantas com potencial terapêutico, uma vez que grande parte dela ainda é coberta por matas nativas que ainda tem baixa influência da civilização devido à baixa densidade populacional.

Entre os componentes da biodiversidade muitos produtos de importância econômica podem ser obtidos, destacando-se os fitoterápicos, produzidos a partir de recursos genéticos vegetais. Preparações feitas a partir de plantas estão entre as formas mais antigas de terapêutica medicinal e tem sido muito utilizada. Devido aos bons resultados, inúmeros medicamentos foram produzidos pela indústria farmacêutica com base na purificação de extratos vegetais, isolamento e identificação de seus princípios ativos, porém apenas uma pequena fração das espécies vegetais conhecidas foi pesquisada quanto aos seus aspectos químicos e farmacológicos, o que indica que ainda há muito a ser pesquisado (KOROLKOVAS; BURCKHALTER, 1988).

Em áreas rurais do Brasil existe um grande número de preparações artesanais feitas a partir de plantas e utilizadas por comunidades tradicionais para tratamento e cura de diversas doenças. O mercado de medicamentos fitoterápicos tem crescido e esta prática tem se tornado uma opção terapêutica devido ao baixo custo e eficácia do tratamento (REIS; MARIOT; STEENBOCK, 2004).

1.2 METABOLISMO VEGETAL

O metabolismo vegetal compreende o conjunto de reações químicas que ocorrem continuamente na célula vegetal, que visam o aproveitamento de nutrientes para satisfazer as necessidades celulares de: energia, poder redutor e biossíntese de macromoléculas (carboidratos, lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos), as quais apresentam funções bem definidas. Estas reações dependem de enzimas específicas, as quais estabelecem as rotas metabólicas, que podem ser anabólicas ou catabólicas (SANTOS, 2004).

Segundo Oliveira, Akisue e Akisue (1998) dentro de populações de uma mesma espécie de planta podem ocorrer diferenças morfológicas, fisiológicas e bioquímicas, sendo que esta variação na composição pode ser devido à presença de diferentes substâncias e ou substâncias em quantidades diferentes. Tais

diferenças são determinadas por diversos fatores intrínsecos e extrínsecos. Os intrínsecos são genéticos, idade e estágio de desenvolvimento da planta, enquanto os extrínsecos ou relacionados com o meio ambiente são: climáticos, edafo-climáticos e edáficos e nas pesquisas com plantas medicinais ou medicamentos fitoterápicos é de fundamental importância observar destas condições além do período de coleta de amostras, pois estes fatores são determinantes na produção de biomassa e de metabólitos secundários, responsáveis pela atividade biológica destas plantas (REIS; MARIOT; STEENBOCK, 2004).

O metabolismo vegetal gera produtos denominados metabólitos primários e secundários. Os metabólitos primários são os protídeos, lipídeos, glicídios e nucleotídeos, que possuem funções vitais no organismo vegetal. Os metabólitos secundários são substâncias não essenciais ao desenvolvimento vegetal e de função ainda não totalmente esclarecida, contudo possuem ação biológica que garante vantagens adaptativas e estão restritos a determinados grupos vegetais (TAIZ; ZEIGER, 2004). Os metabólitos secundários têm importante aplicação nas ciências farmacêuticas, pois estes compostos estão associados ao: uso medicinal das plantas, à produção de fitoterápicos, obtenção de drogas e isolamento de princípios ativos para serem utilizados como modelos na produção de drogas sintéticas (FALKENBERG et al., 2004).

Os três principais precursores dos metabólitos secundários são: ácido chiquímico, precursor de vários compostos aromáticos, acetato (precursor de ácidos graxos, polifenóis, isoprenos, prostaglandinas) e aminoácidos, associados à biossíntese de alcalóides. As principais funções nos vegetais são para proteção contra viroses, bacterioses, infecções fúngicas, herbivoria e também atuam para atrair ou repelir outros organismos e para resistir ao estresse ambiental (TAIZ; ZEIGER, 2004). As rotas dos metabólitos secundários são ativadas em estágios particulares do desenvolvimento e períodos de estresse nos quais ocorrem limitações nutricionais (SANTOS, 2004).

O desenvolvimento de novos fármacos a partir de produtos naturais apresenta limitações, tais como a complexidade do processo de avaliação e caracterização destes metabólitos presentes nestes produtos e para minimizar e solucionar tais problemas é fundamental o desenvolvimento de novas tecnologias e equipamentos (GUERRA; NODARI, 2004).

1.3 ESPÉCIES NATIVAS ESTUDADAS

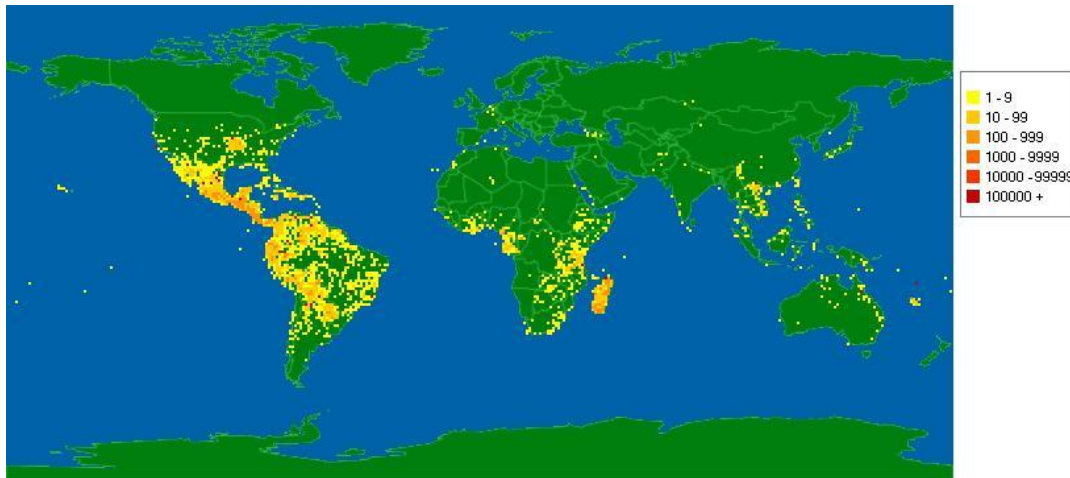
As espécies envolvidas neste estudo são: *Geissospermum argenteum* Woodson, da família Apocynaceae Juss. e *Minquartia guianensis* Aubl, da família Olacaceae R. Br.

1.3.1 Aspectos botânicos da família Apocynaceae Juss.

A família Apocynaceae pertence à divisão Magnoliopyta, classe Magnoliopsida, ordem das Gentianales (FORZZA, 2010). Esta família apresenta uma distribuição predominantemente pantropical (figura 1), mas com representantes em áreas temperadas, sendo composto por ervas, subarbustos, arbustos, árvores ou lianas distribuídos em cerca de 400 gêneros e 3700 espécies. No Brasil, as estimativas divergem sobre o número de representantes desta família encontrados no país. De acordo com Souza e Lorenzi (2005) são cerca de 90 gêneros e 850 espécies e segundo Rapini et al. (2010) são cerca de 75 gêneros e 759 espécies. Entre as espécies desta família existem plantas cultivadas como ornamentais, árvores fornecedoras de madeira de boa qualidade e também espécies utilizadas com propriedades medicinais, devido à presença de alcalóides e glicosídeos em sua composição (SOUZA; LORENZI, 2005).

Em geral espécies desta família apresentam látex branco ou de coloração diferenciada, além de grande quantidade de metabólitos secundários, o que faz da família uma importante fonte de substâncias bioativas (RIBEIRO et al., 1999).

Figura 1 - Distribuição da família Apocynaceae Juss. no mundo



Fonte: <http://tropicos.org/Name/42000278?tab=maps> (2011).

1.3.1.1 Aspectos botânicos do gênero *Geissospermum* Allemão

Geissospermum spp. são nativas e ocorrem no Brasil nas matas de terra firme na Amazônia, principalmente no Amazonas e Pará, mas também ocorrem nas regiões nordeste, sudeste e sul. De acordo com Ribeiro (1999) este gênero apresenta árvores com folhas alterno dísticas, cartáceas, tronco fenestrado e ou acanalado e látex escasso ou ausente. Lorenzi (2002) descreve as características morfológicas da *Geissospermum laeve*, a qual apresenta de 15 a 22 metros de altura, com tronco sulcado e canelado, com diâmetro de 40 a 60 cm, folhas simples, inflorescência em cimeiras axilares, de cor pálida e fruto baga, leitoso com polpa carnososa.

Ainda segundo Lorenzi (2002) este gênero também apresenta látex nos frutos e nas extremidades dos ramos. As árvores deste gênero apresentam madeira pesada, alborno amarelado, diferenciado do cerne mais escuro; grã regular a irregular; textura fina; cheiro indistinto e gosto amargo.

Segundo Forzza (2010) as espécies deste gênero são:

- *G. sericeum* Benth. & Hook. f., espécie nativa; não endêmica, sendo encontrada na norte (Roraima, Amapá, Amazonas, Acre, Rondônia) e nordeste (Maranhão);

- *G. vellosii* Fr. All ou *Geissospermum laeve*, (Vell.) Miers, nativa, não endêmica, presente nas regiões norte (Amapá, Pará, Amazonas), nordeste (Maranhão, Bahia), centro-oeste (Distrito Federal), sudeste (Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro);
- *G. urceolatum* A. H. Gentry (1985), nativa, endêmica, encontrada na região norte (principalmente Pará)
- *G. reticulatum* A. H. Gentry, espécie nativa, não endêmica, encontrada na região norte (Acre, Rondônia);
- *G. argenteum* Woodson.

1.3.1.2 Aspectos botânicos de *Geissospermum argenteum* Woodson

Esta espécie é nativa, distribuindo-se pela região norte, principalmente nos estados do Amazonas, Amapá, Pará, Roraima e também nas Guianas (FORZZA, 2010). Segundo Ribeiro et al. (1999) é uma árvore de dossel, com folhas discolores e reticulação inconspícua encoberta por pêlos prateados e dourados, com a base da folha assimétrica.

1.3.1.3 Aspectos químicos de *Geissospermum* spp.

O gênero *Geissospermum* começou a ser explorado quimicamente no final do século XIX, não só no Brasil, mas por pesquisadores europeus. Entre as espécies do gênero a primeira a ser pesquisada foi o pau-pereira (*G. vellosii* Allemão), a qual foi considerada por Gustavo Peckolt (1861-1923) uma das dez plantas medicinais brasileiras mais importantes (SANTOS et al., 1998) a qual era utilizada no tratamento de febres, falta de apetite, má digestão, tontura, prisão de ventre e malária, sendo que a sua ação curativa estava associada ao seu gosto amargo.

Deste gênero foram isolados diversos alcalóides, os quais estão relacionados na tabela 1 e suas estruturas estão numeradas (p. 22) também conforme a mesma tabela 1. Entre os alcalóides, a geissospermina (1), considerada o principal deles, foi isolada primeiramente por O. Hesse em 1877 (PUISIEUX et al., 1959).

Chiaroni et al. (1976) realizaram estudos com a geissospermina estabelecendo a estereoquímica, através de difração de raios X de sua estrutura cristalina enquanto Goutarel et al. (1978) a estabeleceu através de RMN ^{13}C .

A estrutura da geissosquizina (2) foi proposta por Rapoport et al. (1958) e confirmada por Puisieux et al. (1959). Rapoport e colaboradores (1960) continuaram os estudos com os alcalóides de *G. vellosii*, a geissospermina (1) e as estruturas dos produtos da clivagem indólica: geissosquizina (2) e apogeissosquizina (3). Também Chiaroni e Riche (1979) isolaram o alcalóide geissospermina (1) de *G. laeve* e verificaram que a hidrólise ácida deste conduz à formação de geissosquizina (2) e geissosquizolina (4) e ainda estabeleceram a estereoquímica da molécula. Steele et al. (2002) realizaram estudos com *G. sericeum*, isolando e identificando geissosquizolina (4). Também segundo Werner et al. (2009) a casca de *G. vellosii* possui diversas classes de compostos, principalmente alcalóides, como geissospermina (1), geissosquizina (2) e geissosquizolina (4).

No Brasil o pau-pereira foi muito utilizado no século XIX e atribui-se ao farmacêutico Ezequiel Corrêa dos Santos o isolamento da pereirina (5), que seria o primeiro alcalóide isolado no Brasil, mas a pereirina poderia ser uma mistura de alcalóides. O isolamento da pereirina no Brasil não foi reconhecido na Europa (ALMEIDA et al., 2009). Bertho e Koll (1961) também determinaram a estrutura da pereirina (5) isolada do pau-pereira.

Bejar et al. (1957) isolaram o alcalóide indólico monoterpênico flavopereirina (6), de *G. laeve* e a descreveram como uma base muito forte, diferentemente da geissospermina, uma base fraca. A flavopereirina foi isolada através de cromatografia a partir de uma fração de base forte solúvel em clorofórmio.

Muñoz et al. (2000) também isolaram flavopereirina (6) de *G. laeve* e seu derivado 5,6-dehidroflavopereirina (7) e Brito e Brito (1993) apontam o alcalóide flavopereirina (6) como o composto ativo de *G. vellosii*. Steele et al. (2002) isolaram e identificaram a flavopereirina (6) em *G. sericeum*.

Ban e Seo (1961) relataram um novo método para síntese dos derivados β -carbolicos, incluindo a flavopereirina (6). Posteriormente, Wenkert e Kilzer (1962) publicaram sua síntese da flavopereirina (6) utilizando novos métodos de síntese de alcalóides indólicos, um deles usando o acetato de mercúrio como agente oxidante e outro através de conversão induzida por paládio.

Rapoport e Moore (1962) isolaram três alcalóides de *G. vellosii*: velosimina (**8**), velosiminol (**9**) e geissolosimina (**10**) através de fracionamento de fração pH 7, rica em alcalóides. A velosimina (**8**) e velosiminol (**9**) são indólicos. Em 1973 isolaram um novo alcalóide, geissosvelina (**11**) da mesma espécie (MOORE; RAPOPORT, 1973).

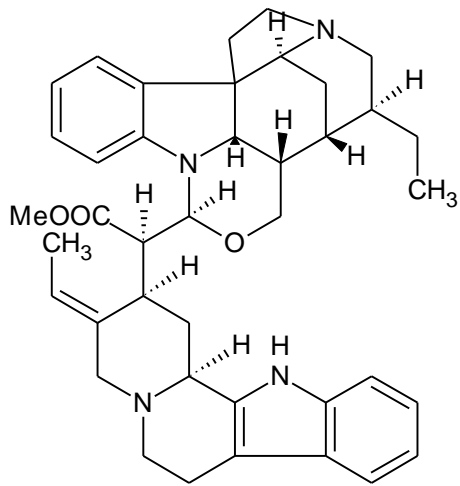
Steele et al. (2002) realizaram estudos com *G. sericeum*, isolando e identificando substâncias como geissosquizolina N⁴-óxido (**12**) e 1,2-dehidrogeissosquizolina (**13**) e Werner et al. (2009) isolaram o alcalóide 12-metoxi-1-metil-aspidospermidina (**14**) da casca de *G. vellosii*.

Paccioni e Husson (1978) realizaram estudos com cascas e folhas de *G. argenteum* coletadas na Guiana Francesa. Para a análise da composição química desta espécie foi realizada extração com clorofórmio, alcalinização com amoníaco 0,8%, fracionamento em coluna, seguida de purificação, permitindo o isolamento de quatro alcalóides, os quais foram identificados através das constantes físicas e propriedades espectrais (RMN, UV). Os quatro alcalóides são: (-)-desmetoxiaspidospermina (**15**), (-)-aspidospermina (**16**), (+)-aspidoscarpina (**17**), e (+)-desmetilaspidospermina (**18**).

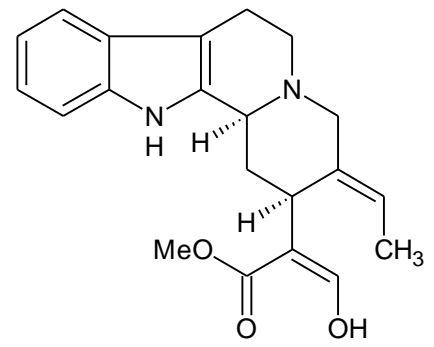
Tabela 1 - Alcalóides encontrados em *Geissospermum* spp.

	Nome	Fórmula molecular	Massa molar	Massa mono isotópica
1	Geissospermina	$C_{40}H_{48}N_4O_3$	632,8341	632,3726
2	Geissosquizina	$C_{21}H_{24}N_2O_3$	352,4269	352,1787
3	Apogeissosquizina	$C_{22}H_{25}NO_2$	335,4394	335,1885
4	Geissosquizolina	$C_{38}H_{52}N_4O_2$	298,4225	298,2045
5	Pereirina	$C_{19}H_{26}N_2O$	298,4254	298,2045
6	Flavopereirina	$C_{17}H_{15}N_2$	247,3139	247,1230
7	5,6-dehidroflavopereirina	$C_{15}H_{15}N_2$	223,2924	223,1230
8	Velosimina	$C_{19}H_{20}N_2O$	292,3749	292,1576
9	Velosimol	$C_{19}H_{22}N_2O$	294,3908	294,1732
10	Geissolosimina	$C_{38}H_{44}N_4O$	572,7822	572,3515
11	Geissovelina	$C_{22}H_{29}NO_3$	355,47056	355,2147
12	Geissosquizolina N ⁴ -óxido	$C_{38}H_{52}N_4O_4$	314,4219	314,1994
13	1,2-dehidrogeissosquizolina	$C_{19}H_{24}N_2O$	296,4067	296,1889
14	12-metoxi-1-metil-aspidospermidina	$C_{21}H_{30}N_2O$	326,4757	326,2358
15	(-)-desmetoxiaspidospermina	$C_{22}H_{30}N_2O$	338,4864	338,2358
16	(-)-aspidospermina	$C_{24}H_{34}N_2O_2$	382,5390	382,2620
17	(+)-aspidoscarpina	$C_{23}H_{32}N_2O_3$	384,5118	384,2413
18	(+)-desmetilaspidospermina	$C_{21}H_{28}N_2O_2$	340,4592	340,2151

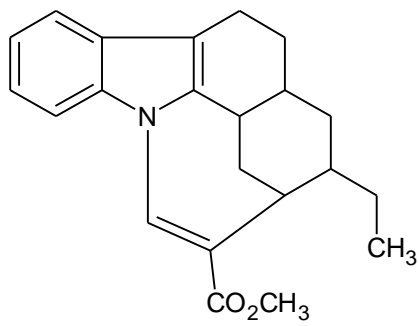
Fonte: Do autor (2011)



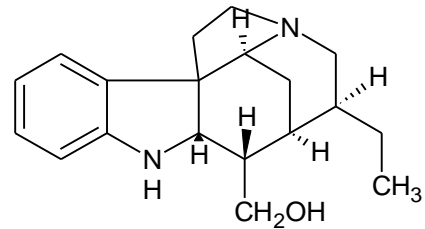
(1)



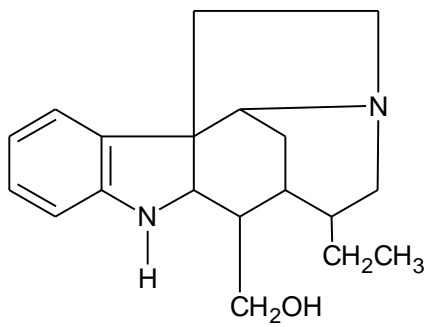
(2)



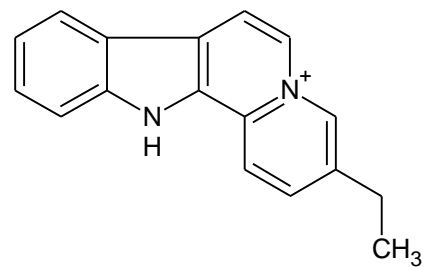
(3)



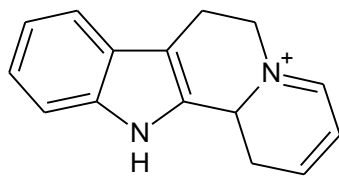
(4)



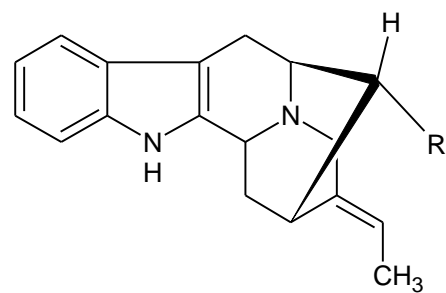
(5)



(6)

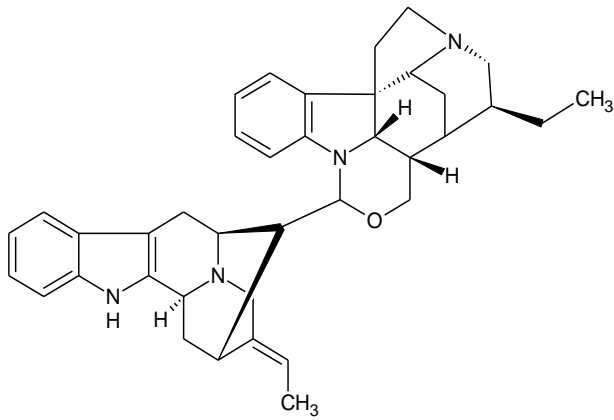


(7)

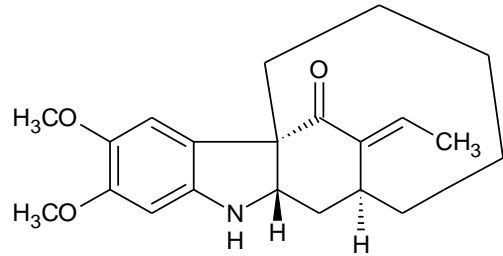


(8): R = CHO

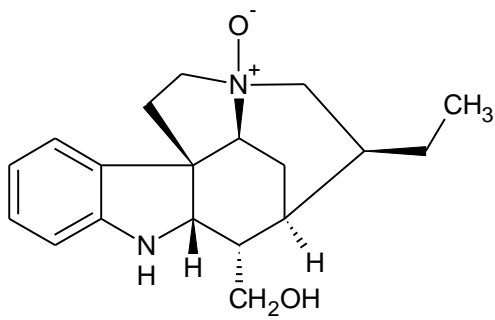
(9): R = CH₂OH



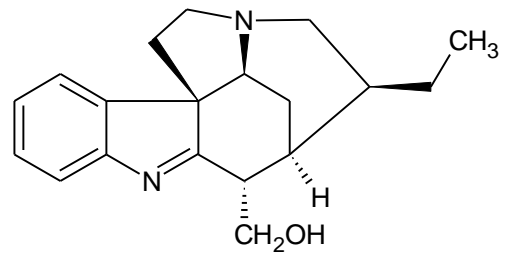
(10)



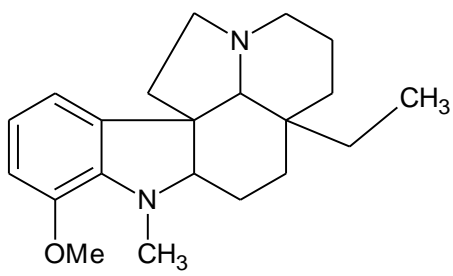
(11)



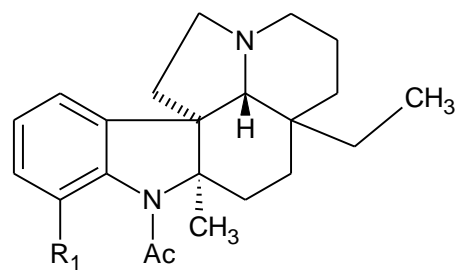
(12)

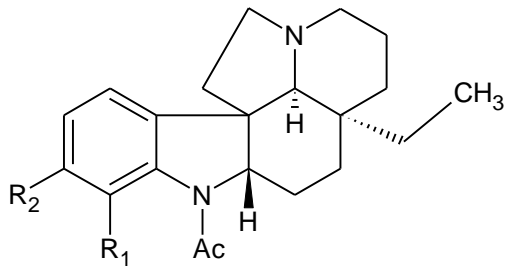


(13)



(14)

(15): $R_1 = H$ (16): $R_1 = OMe$



(17): $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{OMe}$

(18): $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{H}$

1.3.1.4 Aspectos etnobotânicos e etnofarmacológicos de *Geissospermum* spp.

Geissospermum spp recebem nomes populares diversos, de acordo com a região, tais como: pau-pereira, quinarana, quina-quina, acari, acariquara, acariquara branca, entre outros. A acariquara branca é muito usada em madeiras para fabricação de postes, na construção civil, na produção de cabos para ferramentas e implementos agrícolas, sendo por isso explorada de forma inadequada. Além desses usos, sua casca também possui propriedades medicinais (LORENZI, 2002).

Brito; Brito (1993) fazendo uma revisão na literatura sobre a pesquisa com plantas medicinais no Brasil, relatam que extratos obtidos de *G. vellosii* são utilizados como: bloqueador neuromuscular, anticolinesterásico, isto é, atuam inibindo a enzima acetilcolinesterase e hipotensivo e que o composto ativo é o alcalóide flavopereirina (6).

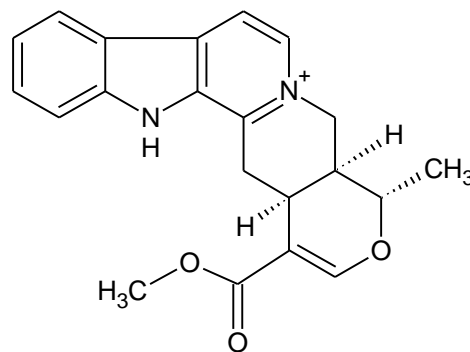
Uma composição farmacêutica foi desenvolvida a partir de flavopereirina (6) para o tratamento de infecções virais por HIV (*Human Immunodeficiency Virus*). A formulação consistia de 250 a 500 mg do princípio ativo para ser administrada oralmente ou 200-600 μg por via intradérmica (ABRAXAS BIO LABS SA, 1994).

A casca de *G. vellosii* é freqüentemente utilizada no preparo de medicamentos tradicionais empregados na medicina popular no tratamento de problemas hepáticos, febre, distúrbios estomacais, constipação, estimulante sexual, malária e para dor (MUÑOZ et al., 2000; JÁCOME; SOUZA; OLIVEIRA, 2003; WERNER et al., 2009).

Uma formulação natural foi desenvolvida a partir da associação de extrato de casca obtido da planta conhecida popularmente como pau pereira (gênero

Geissospermum Allemão) e de extrato de *Rauvolfia vomitoria* Afzel., também pertencente à família Apocynaceae Juss., para uso na prevenção e tratamento de câncer de próstata. Este fitoterápico, contém os alcalóides beta-carbônicos, flavopereirina (6), oriundo do pau-pereira e alstonina (figura 2), da *Rauvolfia vomitoria* Afzel , na proporção 3-4:1 respectivamente.

Figura 2: Alstonina



Fonte: Do autor (2011)

Estes alcalóides apresentam diferentes mecanismos de ação na prevenção e controle do câncer, o que justifica a sua associação. O mecanismo de ação desta formulação natural se baseia na indução da apoptose ou morte celular programada, através da desestabilização do DNA da célula cancerígena. Quando esta formulação é utilizada em concentração adequada o mecanismo torna-se seletivo para as células neoplásicas. Este medicamento natural também atua reduzindo níveis de PSA (*Prostate Specific Antigen* ou antígeno prostático específico), um importante marcador para este tipo de câncer, e atenuando sintomas da hiperplasia benigna de próstata. No preparo desta formulação é feita uma purificação parcial para eliminar compostos tóxicos (NATURAL SOURCE INTERNATIONAL, 2005).

Werner et al. (2009) demonstraram que o extrato obtido de *G. vellosii* Fr. All, principalmente o extrato bruto etanólico e a fração diclorometano, exerceram pronunciada antinocicepção contra modelos químicos de nocicepção, isto é, de dor, produzidos por ácido acético e formalina em camundongos, sendo que as doses utilizadas (1 mg/kg, 10 mg/kg, 30 mg/kg, 100mg/kg de peso do animal) não

interferiram no desempenho do sistema locomotor. O efeito antinociceptivo da fração diclorometano envolveu uma interação com receptores do sistema serotoninérgico 5-HT_{1A}. O alcalóide isolado e identificado como participante dessa interação foi o 12-metoxi-1-metil-aspidospermidina (**14**) o que contribuiu para a explicação das propriedades antinociceptivas relatadas para esta planta.

Estudos envolvendo a atividade anticolinesterásica, isto é, da inibição da enzima acetilcolinesterase, foram realizados por Lima et al. (2009) que também verificaram o efeito da fração alcalóide em testes de memória em camundongos. Este alcalóide foi identificado como geissospermina (**1**) obtido da casca do tronco de *G. vellosii*, e sua ação promoveu a redução da amnésia induzida por escopolamina em camundongos, modelo de déficit colinérgico validado para desenvolvimento de drogas usadas no tratamento sintomático de Doença de Alzheimer, concluindo que compostos presentes nesta planta têm atividade anticolinesterásica e podem reverter déficits cognitivos em modelos com hipofunção colinérgica.

CORREIA et al. (2008) realizaram estudo sobre a atividade antimicrobiana de extratos brutos etanólicos, preparados através de maceração de dez espécies diferentes de plantas da Amazônia coletadas no estado do Amapá. *G. argenteum*, também conhecida por quinarana da “fruta pequena”, foi uma das plantas coletadas, uma vez que há poucos estudos sobre esta espécie. Nos testes antimicrobianos foi utilizada a técnica de difusão em ágar, com permeação de discos de 6 mm de diâmetro com extratos etanólicos em concentrações de 80 µg a 1,25 µg. Os extratos foram testados frente à cepas ATCC (*American Type Culture Collection*) e cepas multidrogas resistente, obtidas de uma coleção hospitalar. Neste estudo *G. argenteum* apresentou atividade contra *Staphylococcus aureus* Rosenbach (1884) multi-resistente em concentração inibitória mínima (CIM) de 5 µg e nos testes frente à cepas ATCC apresentou atividade contra *Pseudomonas aeruginosa* Mig. (1900) com CIM de 20 µg e frente a *S. aureus*, com CIM de 80 µg.

Um dos mais relevantes usos deste gênero de plantas encontrado na literatura foi no tratamento da malária.

Brandão et al. (1992) realizaram levantamento de plantas usadas como antimaláricas em duas regiões da Amazônia (uma ao sul do Pará e outra no nordeste de Rondônia). Neste estudo 41 plantas foram citadas para uso no tratamento e um (1) na prevenção. Das plantas citadas 21 foram coletadas, destas 9 foram testadas experimentalmente *in vitro*, contra *P. falciparum* Welch (1897) e *in*

vivo, contra *P. berghei* Vincke e Lips (1948), em ratos. Extratos de casca de *G. sericeum* Benth. e Hook., uma das plantas coletadas, foram inativos nos testes *in vivo*.

Milliken (1997) realizou levantamento etnobotânico, entre grupos indígenas de savana e de floresta, de plantas utilizadas no tratamento da malária no estado de Roraima. Ao final do estudo 99 espécies de 82 gêneros, pertencentes a 41 famílias foram citadas como antimaláricas, sendo a maioria de floresta (53). Entre as famílias citadas está a Apocynaceae Juss., com três gêneros e quatro espécies, sendo uma delas *G. sericeum* Benth. e Hook., que é árvore comum em florestas de algumas localidades de Roraima, conhecida popularmente como quina-quina devido a casca amarga. A infusão ou decoção de sua casca pode ser abortiva e é usada no tratamento de malária por povos Wapixana, Wai-Wai, Macuxi, Taurepang e Xiriana (Yanomami). Neste levantamento um entrevistado citou o seu uso como profilática associada às raízes de *Citrus aurantiifolia* (Christm.) Swingle, pertencente à família Rutaceae Juss. Também foi verificado que plantas antimaláricas são utilizadas como abortivas, incluindo *G. sericeum* Benth. e Hook., o que é explicado pelo extremo gosto amargo, que pode também ser relacionado com a sua toxicidade.

Um estudo sobre a atividade antimalárica envolvendo trinta espécies de plantas tradicionais foi realizado entre os índios Chacobo, uma comunidade nativa da Amazônia boliviana. Nesta pesquisa a atividade antimalárica foi testada *in vitro* e *in vivo*. Entre as plantas testadas, *G. laeve* apresentou boa atividade antimalárica, com CI_{50} de 3,1 $\mu\text{g/mL}$ para a cepa F32 (cloroquina sensível) e 2 $\mu\text{g/mL}$ para a cepa Indo (cloroquina resistente), demonstrando a coerência do uso tradicional, porém nos testes *in vivo* com *Plasmodium berghei* Vincke e Lips (1948) foi inativo e também verificou-se toxicidade dos extratos na dose de 100 mg/kg de peso por 4 dias (MUÑOZ et al., 2000).

Steele et al. (2002) realizaram testes antiplasmódicos *in vitro* com extratos hidroalcoólicos (MeOH: H₂O; 9:1) obtidos de casca de *G. sericeum* e também com substâncias isoladas. Nestes testes foram utilizadas as cepas K1 (cloroquino-resistentes) e T9-96 (cloroquino-sensíveis) e os resultados obtidos foram: para extrato bruto, CI_{50} de $1,78 \pm 0,047 \mu\text{g/mL}$, testado somente em K1; para geissosquizolina (4) e geissosquizolina N⁴-óxido (12), $CI_{50} > 40 \mu\text{M}$ (inativo), para ambas as cepas; para 1,2-dehidrogeissosquizolina (13), IC_{50} de $27,26 \pm 10,9 \mu\text{M}$

frente a K1 e $35,37 \pm 2,36 \mu\text{M}$ para T9-96; para flavopereirina foi obtido CI_{50} de $11,53 \pm 0,54 \mu\text{M}$ frente a K1 e $1,83 \pm 0,10 \mu\text{M}$ para T9-96.

Na Guiana Francesa, nordeste da América do Sul, foi realizado um estudo envolvendo preparações tradicionais utilizadas no tratamento da malária, as quais foram selecionadas de acordo com a maior porcentagem de uso pela população. Nesta avaliação 35 preparações, de 23 espécies diferentes de plantas, foram preparadas em suas formas tradicionais e a atividade esquizonticida destas foi avaliada *in vitro* em *P. falciparum* Welch (1897) resistente a cloroquina. Neste estudo 40 g de cascas de *G. laeve* foram colocadas em 1L de água e fervidas por 15 minutos, enquanto 40 g cascas obtidas de *G. argenteum* foram maceradas em 250 mL de rum por um mês. Após evaporação total dos solventes, a preparação de *G. laeve* foi testada *in vitro*, apresentando-se inativa e *in vivo* frente a *Plasmodium yoelii* Landau, Michel e Adam (1968) e apresentou inibição de 35 % na dose de 23 mg/kg de peso do roedor. A preparação feita com *G. argenteum* não foi testada *in vitro*, porém *in vivo*, na dose de 324 mg/kg de peso do animal, verificou-se uma inibição de 44,3 % frente a *P. yoelii*. Extratos de *G. argenteum* também foi testados no estágio hepático do *P. yoelii* e apresentaram 83 % de inibição do ciclo intra-hepático do parasita, justificando o seu uso como preparação preventiva (BERTANI et al., 2005).

Estudo etnofarmacológico, realizado entre indivíduos de diferentes grupos e nacionalidades, através de preenchimento de questionários, na Guiana Francesa, apontou o uso freqüente de 34 espécies de preparações tradicionais como antimaláricas. Nas entrevistas foi verificado o grau de conhecimento geral do entrevistado sobre malária enquanto doença e também sobre o tratamento. Verificou-se também que há disponibilidade de tratamento biomédico, porém os indivíduos fazem uso tanto das drogas modernas, quanto das preparações tradicionais, pois de acordo com os entrevistados, o uso destes garante a “cura real”, uma vez que a “planta purifica o sangue e o fígado”. *Geissospermum* spp. foram citadas como plantas usadas na prevenção da malária (VIGNERON et al., 2005).

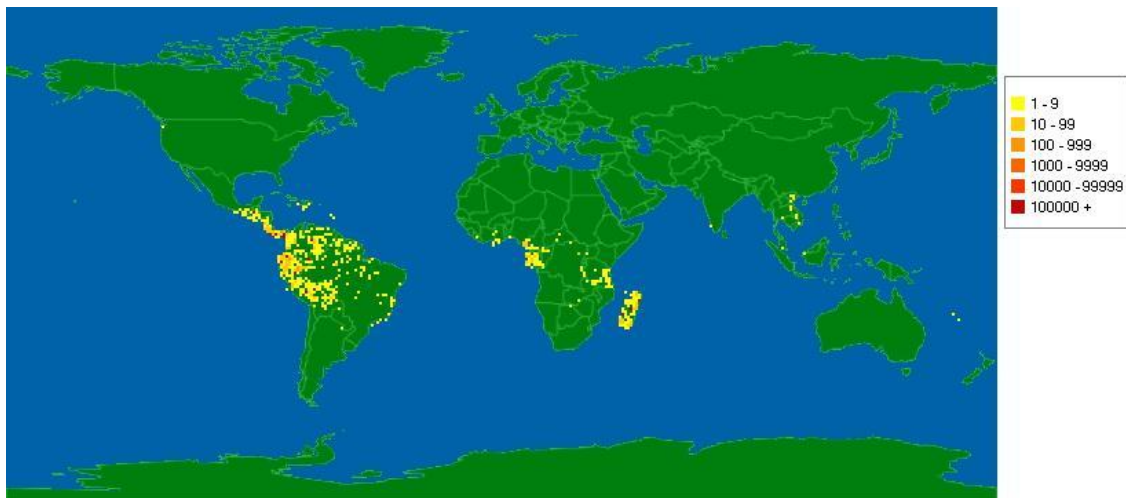
De acordo com Mariath et al. (2009) pesquisas são necessárias para o desenvolvimento de novas drogas seguras e efetivas para o tratamento da malária, pois o *Plasmodium* tem desenvolvido resistência às drogas já existentes e os produtos naturais podem oferecer substâncias com propriedades biológicas e farmacológicas que podem ser utilizadas para a síntese de novos medicamentos.

Segundo Andrade-Neto et al. (2007), a busca por substâncias ativas em plantas medicinais é muito promissora, além de ser estratégica para a descoberta de novas drogas antimaláricas.

1.3.2 Aspectos botânicos da família Olacaceae R. Br.

Compreendem arbustos e árvores que ocasionalmente podem produzir látex, suas folhas são alternas, flores não vistosas e fruto do tipo drupa. Esta família apresenta distribuição tropical (figura 3), incluindo 27 gêneros e cerca de 200 espécies, sendo que no Brasil há em torno de 13 gêneros e 60 espécies, em sua maioria presentes na Amazônia. Entre os gêneros desta família nativos da Amazônia, encontra-se a *Minquartia* (SOUZA; LORENZI, 2005).

Figura 3 - Distribuição da família Olacaceae R. Br. no mundo



Fonte: <http://tropicos.org/Name/42000210?tab=maps&usenonflash=1> (2011)

1.3.2.1 Aspectos botânicos de *Minquartia guianensis* Aubl.

Esta espécie é encontrada na América Central, principalmente Nicarágua e Panamá, na Amazônia e Guianas. No Brasil está presente nos estados do Acre, Amazonas, Roraima, Pará e Amapá, recebendo nomes populares diversos, tais como: acariquara, acariquara roxa, acari, acaximba, entre outros (CAMARGO; FERRAZ, 2005).

Segundo Ribeiro et al. (1999) a esta espécie pertencem árvores de dossel, tronco fenestrado e acanalado, as quais possuem látex no limbo e pecíolo, às vezes no tronco.

1.3.2.2 Aspectos químicos de *M. guianensis* Aubl.

M. guianensis ainda foi pouco estudada quimicamente e alguns dos compostos encontrados nesta espécie estão descritos na tabela 2 e as fórmulas estruturais nas páginas 34 e 35, conforme numeração da tabela. Marles (1989) realizou estudo da composição química de extrato clorofórmico preparados a partir de casca de *M. guianensis*, através métodos cromatográficos e espectrométricos, isolando e identificando um novo poliacetileno, o ácido (-)-17-hidroxi-9,11,13,15-octadecatetraínico (**19**), também chamado de ácido minquartinóico (**19**).

Rasmussen et al. (2001) isolou o ácido minquartinóico (**19**), considerado o principal constituinte do extrato de *M. guianensis*, pois está presente em grande quantidade na casca, cerca de 2 a 3% do peso seco. Também foi estabelecida que a configuração absoluta do C-17 (carbono 17) é (+) – (S) através da conversão para o conhecido (+) - (S) - 17 - ácido hidroxiesteárico (**25**), o que foi confirmado pelo método de Mosher, além da estrutura do (-)- (R)-O éster-metilmandélico (**20**).

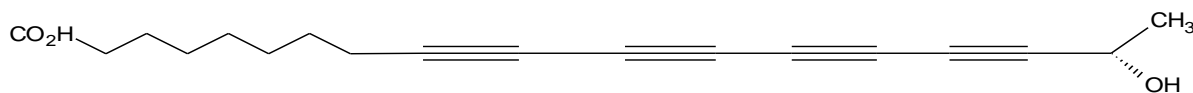
Estudo da composição química de *M. guianensis* também foi realizado por Cursino et. al. (2009), no qual extratos diclorometânicos foram analisados em cromatografia de camada delgada (CCD) apresentando indícios de terpenóides, sendo por isso, fracionado através de cromatografia em coluna e de recristalizações. As frações com terpenos foram selecionadas para a identificação dos triterpenos, a qual foi feita por análise de RMN de ^1H e ^{13}C , através das quais foi possível identificar o taraxerol (**21**), lupeol (**22**), lupen – 3 – ona (**23**) e o esqualeno (**24**).

De acordo com Ruiz e colaboradores (2011) extratos hidroalcoólicos de casca de *M. guianensis* apresentam em sua composição química: flavonóides, terpenos, triterpenos, os quais foram identificados através um screening químico realizado em CCD (cromatografia em camada delgada).

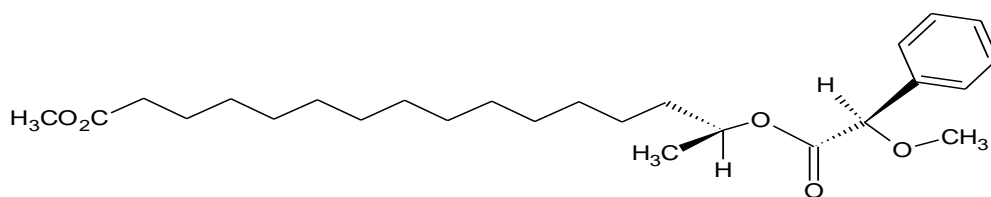
Tabela 2 - Substâncias encontradas em *Minquartia guianensis*

Nº	Nome	Fórmula molecular	Massa molar	Massa mono isotópica
19	ácido minquartinóico	$C_{18}H_{20}O_3$	284.3496	
20	(-)-(R)-O éster-metilmandélico	$C_{26}H_{42}O_5$	434.6086	434.3023
21	Taraxerol	$C_{30}H_{50}O$	426.7174	426.3862
22	Lupeol	$C_{31}H_{52}O$	440.7440	440.4018
23	Lupen-3-ona	$C_{30}H_{48}O$	424.7015	424.3705
24	Esqualeno	$C_{30}H_{50}$	410.718	410.3912
25	(+) (S) 17 ácido hidroxiesteárico	$C_{18}H_{36}O_3$	300.4766	
26	R ₂	$C_{19}H_{38}O_3$	314.5032	

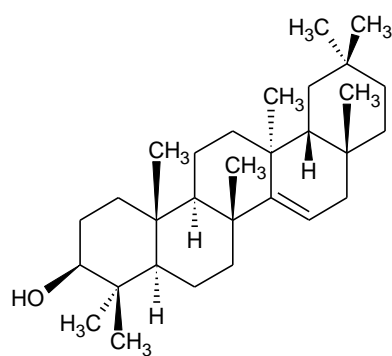
Fonte: Do autor (2011)



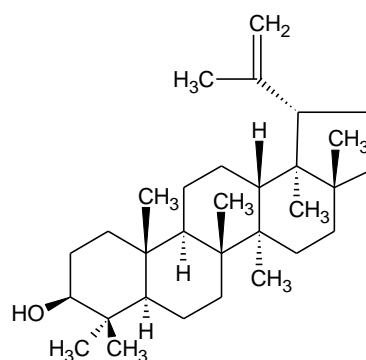
(19)



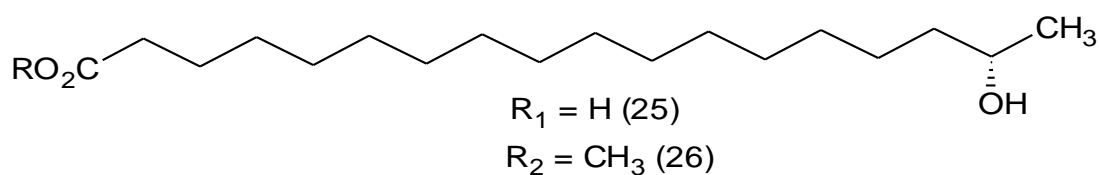
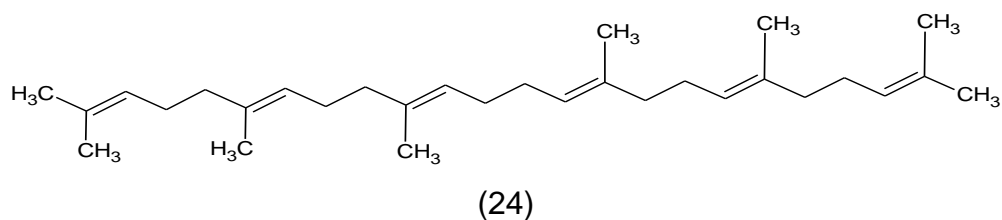
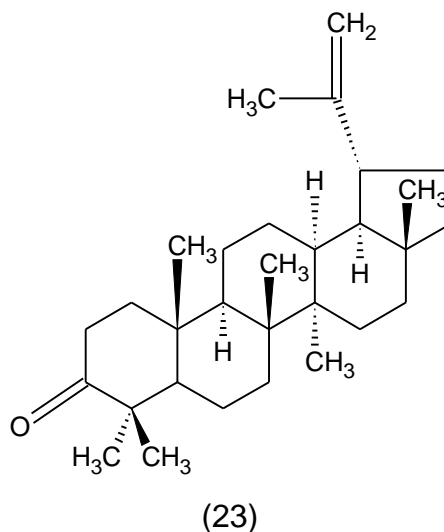
(20)



(21)



(22)



1.3.2.3 Aspectos etnobotânicos e etnofarmacológicos de *M. guianensis*

Marles (1989) relata que populações indígenas (Quijos Quichua) do Equador usam infusão de cascas de *M. guianensis* no tratamento de câncer de pulmão, tuberculose, parasitoses intestinais, além de utilizá-las topicamente para aliviar dores musculares e irritações cutâneas.

Em levantamento etnobotânico realizado no estado de Loreto no Peru, verificou-se que *M. guianensis* era amplamente utilizada pela população local para tratamento de malária e leishmaniose e testes *in vitro* frente à cepa 3D7 de *P. falciparum*, cloroquino-sensível, de seu principal constituinte, o ácido minquartinóico (**19**) indicaram atividade antimalárica com CI₅₀ de 3,0 ± 0,5 µg/mL (RASMUSSEN et al., 2000).

Estudo etnobotânico foi realizado em três regiões do Equador, com o objetivo de identificar plantas utilizadas no tratamento da leishmaniose e entre as plantas citadas está presente a *M. guianensis*. Nesta pesquisa foram coletadas trinta e nove plantas e preparados cento e quarenta extratos, os quais foram testados frente à *Leishmania donovani*, *Plasmodium falciparum* Welch e *Trypanosoma cruzi*, sendo que *M. guianensis* apresentou atividade contra *Leishmania donovani* (GACHET et al., 2010).

Ao longo do rio Nanay (Peru) foi realizado um levantamento etnofarmacológico, envolvendo grupos nativos de seis diferentes áreas com o objetivo de identificar as plantas utilizadas no tratamento da malária. Através do levantamento foi obtida uma lista de cinqüenta e nove plantas, pertencentes a 38 famílias. Dessas cinqüenta e nove, foram selecionadas as vinte e uma plantas mais citadas nas entrevistas para serem coletadas e testadas para atividade antimalárica, das quais oito apresentaram interessante atividade antiplasmódica, frente à cepa, cloroquino-sensível, FCR-3, de *P. falciparum*, entre elas a *M. guianensis*, com $CI_{50} = 4,2 \mu\text{g/mL}$ (RUIZ et al., 2011).

1.4 ASPECTOS GERAIS DA MALÁRIA

A malária também é conhecida por paludismo, febre palustre, impaludismo, febre intermitente, febre terçã benigna, além de nomes como: maleita, sezão, tremedeira, batedeira ou febre (BRASIL, 2005).

A malária remonta a 250000 a 150000 anos atrás. Teve origem na África e em escritos chineses (3000 a.C.), nas tábuas cuneiformes (2000 a.C.) e nos Vedas da Índia (entre 1000 e 800 a.C.) aparecem relatos das febres intermitentes. Ela foi descrita por Hipócrates na era pré-cristã. Ele descreveu as febres diárias, terçã e quartã, além de suas características de ocorrência sazonal e de febre com padrão intermitente e paroxístico (NEVES, 2010). Apesar de a doença ser muito antiga o termo malária surgiu no início do século XIX, através de escritores italianos que diziam que a doença era causada por “vapores nocivos” dos pântanos, chamando-a de “mal ária”, ou seja, “mau ar”. Em 1880 o parasita foi descrito pela primeira vez pelo médico francês Charles Louis Alphonse Laveran, ao observar sangue humano de um paciente com malária. Já em 1885, Golgi e colaboradores descreveram o

ciclo assexuado do parasita e em 1891 a morfologia tornou-se conhecida através dos esfregaços sanguíneos corados. Mas o ciclo completo do parasita só foi conhecido entre 1898 e 1899 através de estudos dos pesquisadores italianos Grassi e colaboradores, comprovando assim a teoria da transmissão da doença por mosquitos (NEVES, 2010).

A malária é causada por protozoários do gênero *Plasmodium* Marchiafava e Celli (1885) e transmitida ao homem através da picada da fêmea infectada do mosquito pertencente à ordem Diptera, família Culicidae e gênero *Anopheles* Theobald (1901). As principais espécies transmissoras da malária no Brasil, tanto na zona rural quanto na zona urbana, são: *A. darlingi* Root, *A. aquasalis* Curry (1932), *A. albitarsis* Linthicum (1988), *A. cruzii* Dyar e Knab (1908) e *A. bellator* Dyar e Knab (1906). A espécie *A. darlingi* se destaca na transmissão da doença na Amazônia. Popularmente, os vetores da malária são conhecidos por “carapanã”, “muriçoca”, “sovela”, “mosquito-prego” e “bicuda”.

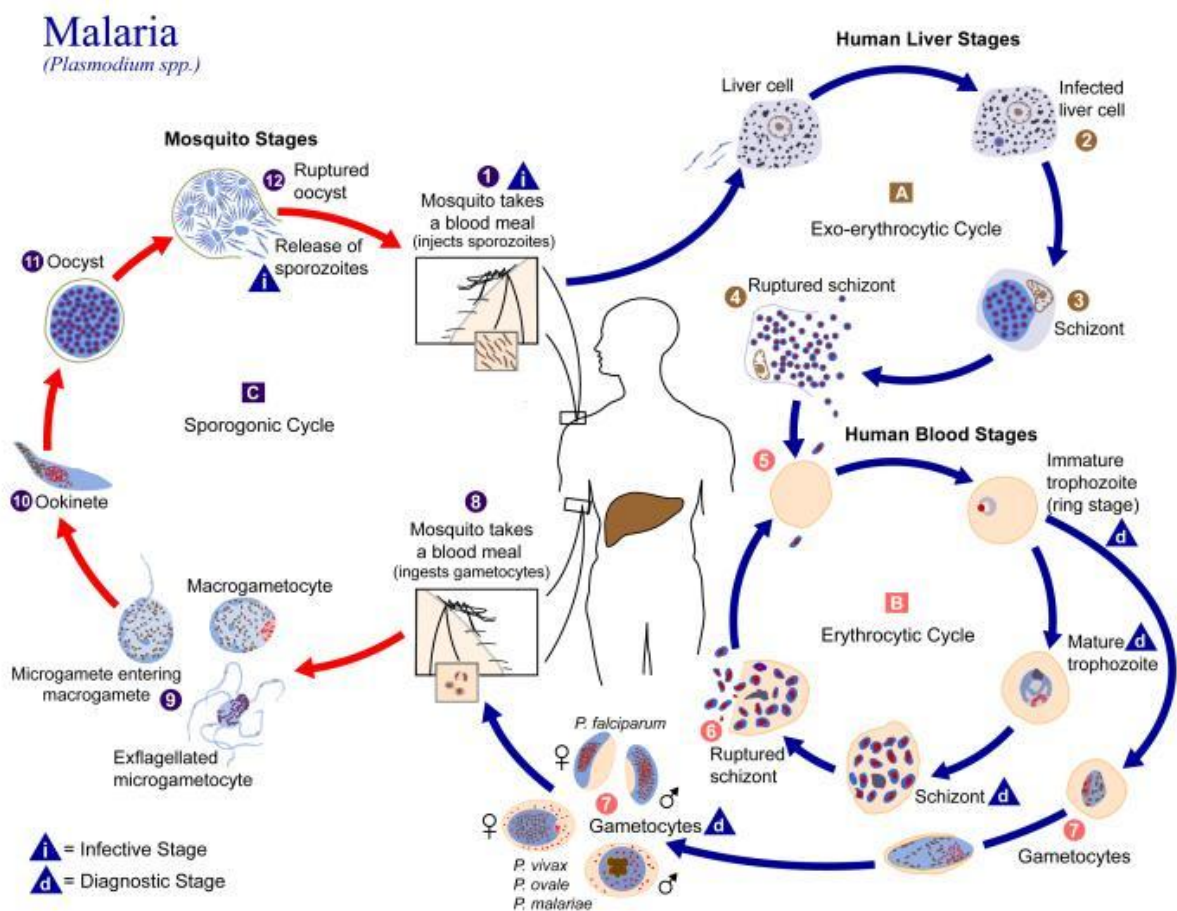
1.4.1 Generalidades do parasita

O agente etiológico da malária pertence ao filo Apicomplexa, família Plasmodidae e ao gênero *Plasmodium* Marchiafava e Celli. Mais de 150 espécies de *Plasmodium* são causadoras de malária em diferentes hospedeiros vertebrados, sendo que apenas 5 espécies são parasitas do homem: *P. falciparum* Welch (1897), *P. vivax* Grassi e Feletti (1890), *P. malariae* Grassi e Feletti (1889), *P. ovale* Stephens (1922) e *P. knowlesi* Sinton e Mulligan (1932).

O *Plasmodium* apresenta um ciclo com duas fases distintas (Figura 4), uma ocorre no mosquito e outra no homem. A infecção se inicia quando os esporozoítos são inoculados na pele do homem pelo vetor, alojando-se nos hepatócitos, onde se multiplicam por esquizogonia dando origem aos esquizontes teciduais, que por sua vez originam milhares de merozoítos que rompem os hepatócitos indo para a circulação sanguínea, onde penetram nas hemácias (NEVES, 2010). Na fase sanguínea os merozoítos rompem hemácias, invadindo outras, ocorrendo ciclos repetitivos de multiplicação eritrocitária, os merozoítos se diferenciam em trofozoítos jovens e posteriormente maduros. Depois de algumas gerações de merozoítos alguns se diferenciam em formas sexuadas, os gametócitos, que quando ingeridos

pelo anofelino darão início ao ciclo sexuado no mosquito, onde o microgameta masculino fecunda o macrogameta feminino formando o zigoto que se encista na camada epitelial do intestino médio sendo chamado de oocisto, que passa por divisão esporogônica, dando origem aos esporozoítos que após o rompimento do oocisto são liberados para as glândulas salivares do mosquito (NEVES, 2010).

Figura 4 - Ciclo do *Plasmodium*



Fonte: www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=s0103-40142008000300008 (2011)

1.4.2 Aspectos epidemiológicos da malária no Brasil e em Roraima

A malária permanece entre as principais parasitoses do mundo e também um dos maiores problemas de saúde pública, especialmente nos países africanos. Estima-se, ainda, que cerca de 40 % da população mundial viva em área de risco de infecção em cerca de 100 países (MARIATH et al., 2009)

No Brasil foram relatados em 2009, 2617773 casos suspeitos de malária, desses 308498 foram confirmados. Dos casos confirmados 47729 foram causados por *P. falciparum* Welch e 257571 por *P. vivax* Grassi e Feletti. Outros casos somaram 3.198, sendo que o número de mortes foi 79 para o mesmo período (WHO, 2010). No Brasil a Amazônia legal (Acre, Amazonas, Amapá, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins) concentra 99,5% dos casos, onde 90 municípios foram identificados como sendo de alto risco para a transmissão (BRASIL, 2010).

O estado de Roraima localiza-se no extremo norte do Brasil, no domínio morfoclimático da Amazônia ou Hiléia, apresentando diferentes paisagens, desde florestas até o lavrado (CARVALHO, 2009). Estas paisagens se refletem em diferentes ambientes para a transmissão da malária (ROSA-FREITAS et al., 2010). Ainda segundo Rosa-Freitas et al. (2010) foram elaborados mapas, baseados em ocorrências conhecidas e modelos de predição, indicando a presença dos anofelinos no estado. Este estudo demonstrou a ocorrência de sete espécies de anofelinos: *A. darlingi* Root, *A. albitarsis* Linthicum (1988), *A. braziliensis* Chagas (1907), *A. triannulatus* Neiva e Pinto (1922), *A. nuneztovari* Galbadón (1940), *A. peryassui* e *A. oswaldoi* Peryassú (1922). Assim nos diversas ambientes do estado há condições adequadas para que a malária continue a ser endêmica, com maior risco para as florestas, habitat do principal vetor, *A. darlingi* e *A. albitarsis* (vetor secundário). De acordo com dados SIVEP, Sistema de Informações de Vigilância Epidemiológica, em 2009 ocorreram 4479 casos, enquanto que em 2010 foram 9952 casos, o que representa um aumento de 122% no número de casos. Também foi registrado um aumento no número de casos de malária causada por *P. falciparum*, de 554 casos em 2009 para 1441 casos em 2010 (BRASIL, 2011).

1.4.3 Controle da malária

O tratamento adequado da malária é o principal enfoque para o controle da doença, pois ensaios de vacinação em macacos evidenciaram a especificidade na produção de anticorpos para cada estágio parasitário e para cada espécie de *Plasmodium*, o que dificulta o desenvolvimento da vacina (REY, 2008). A cloroquina já foi utilizada para o tratamento das quatro espécies de *Plasmodium* que parasitam

o homem, contudo *P. falciparum* desenvolveu resistência a ela e outros antimaláricos, tornando este tipo de malária um desafio.

O Ministério da Saúde tem uma política nacional para o tratamento da malária, segundo o qual orienta a terapêutica e disponibiliza gratuitamente os medicamentos, através do SUS (Sistema Único de Saúde). De acordo com as normas estabelecidas o tipo de tratamento depende de: espécie de plasmódio; idade do paciente; história de exposição anterior à infecção; outras condições associadas, como gravidez e outras doenças; gravidade da doença. De acordo com os protocolos de tratamento as drogas são associadas, sendo que para *P. falciparum* indica-se artemeter + lumefantrina, artesunato + mefloquina, quinina + doxiciclina + primaquina. Para *P. vivax* ou *P. ovale* são utilizadas: cloroquina + primaquina (BRASIL, 2010).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Contribuir para o conhecimento da ação antimicrobiana e antimalárica de extratos brutos e ou frações obtidas de casca, folhas e galhos de *G. argenteum* e *M. guianensis*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

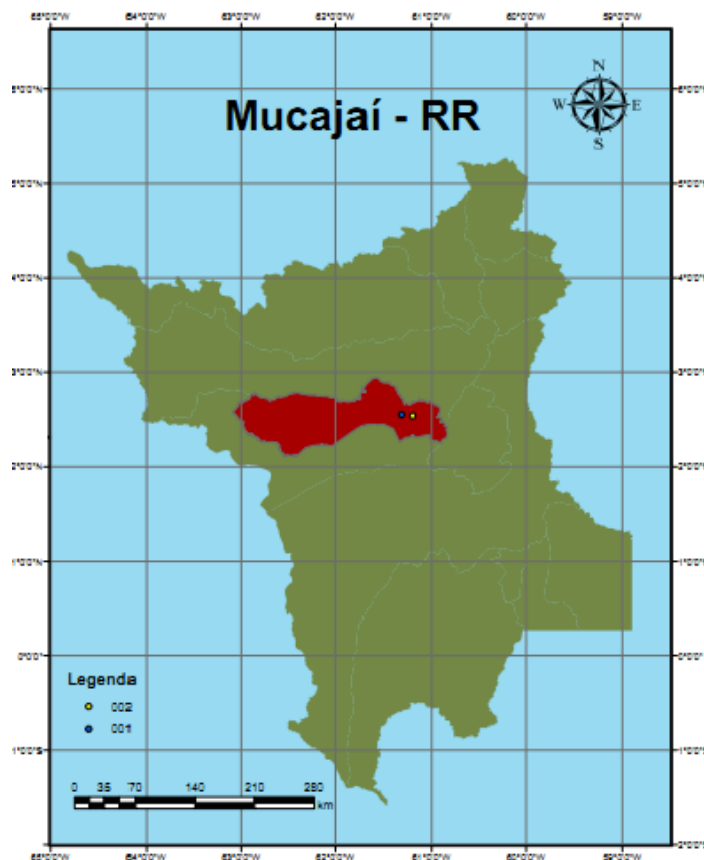
- Caracterizar a composição química de extratos de galhos e cascas de *G. argenteum*;
- Identificar extratos, frações e ou substâncias ativas de *G. argenteum* e *M. guianensis* com atividade antimalárica contra *P. falciparum* *in vitro*;
- Determinar a CI_{50} das amostras ativas contra cepa K1 de *P. falciparum*;
- Caracterizar atividade antibacteriana *in vitro* de extratos, frações e ou substâncias obtidos de *G. argenteum* e *M. guianensis* em cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans*;
- Caracterizar atividade antifúngica *in vitro* de extratos, frações e ou substâncias obtidos de *G. argenteum* e *M. guianensis* em cepa de *Candida albicans*;
- Determinar a CIM das amostras.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ÁREA DE COLETA

Foram realizadas coletas de plantas de espécies diferentes, em área florestada de uma propriedade rural particular, localizada na colônia Apiaú (figura 5), no município de Mucajaí, estado de Roraima. Para realizar a coleta foi obtida a anuência prévia dos proprietários. O projeto de pesquisa foi cadastrado no Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO, sob nº 26217-1 e código de autenticação nº 22824753. A coleta e o transporte do material também foram realizados de acordo com as normas do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente - IBAMA e dos Recursos Naturais Renováveis.

Figura 5 - Estado de Roraima com a localização de município de Mucajaí (vermelho) e neste os dois pontos de coleta (1 e 2)



Fonte: Costa Filho, R. (2011)

3.2 COLETA E IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA DE *Minquartia guianensis* AUBL

A amostra de *M. guianensis* (figura 6) utilizada nesta pesquisa, coletada dia 06/10/2010, é de uma árvore de aproximadamente 25 m de altura, sem flores ou frutos, situados em uma área de mata fechada, às margens de um igarapé.

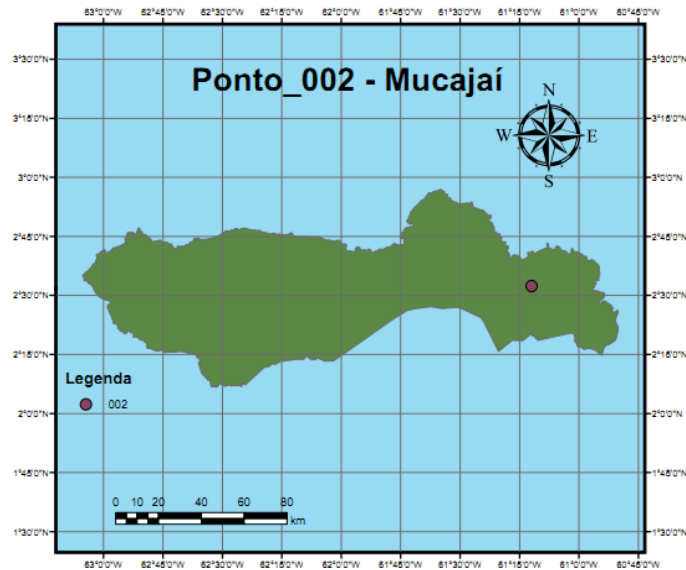
Figura 6 - *Minquartia guianensis*. a) visão geral; e b) tronco sulcado



Fonte: Do autor (2010)

A árvore foi georreferenciada em GPS (*Global Position System*), Garmin 60CSX, localizando-se à 61°19' W e 2°32' N (figura 7). Também foram coletadas amostras de material para herborização, as quais foram levadas para identificação no Herbário do INPA, Manaus-AM, onde se encontram depositadas.

Figura 7- Localização de *Minquartia guianensis* (árvore no qual foi realizada a coleta)



Fonte: Costa Filho, R. (2011)

Foram confeccionadas três exsicatas do indivíduo, medindo 29 x 42 cm, contendo folhas e frutos, sendo uma delas (figura 8) depositada no INPA (Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus) sob número 240226. A identificação botânica foi realizada pelo técnico em identificação botânica José Ramos.

Figura 8 - Exsicata de *Minquartia guianensis* depositada no herbário do INPA

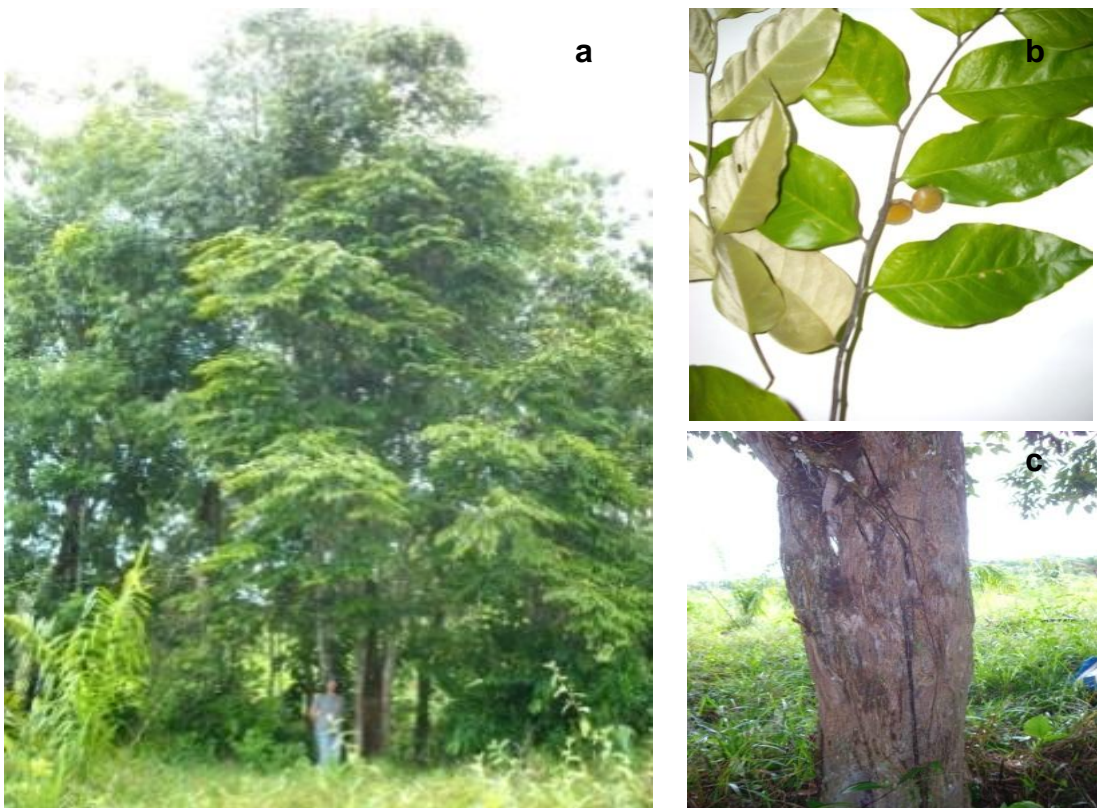


Fonte: Do autor (2011)

3.3 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DE *G. argenteum* WOODSON

A amostra de *G. argenteum* (figura 9), foi coletada de uma árvore com cerca de 12 m de altura, com tronco sulcado tal como descrito por Ribeiro et al. (1999). A coleta inclui folhas, cascas do tronco e galhos.

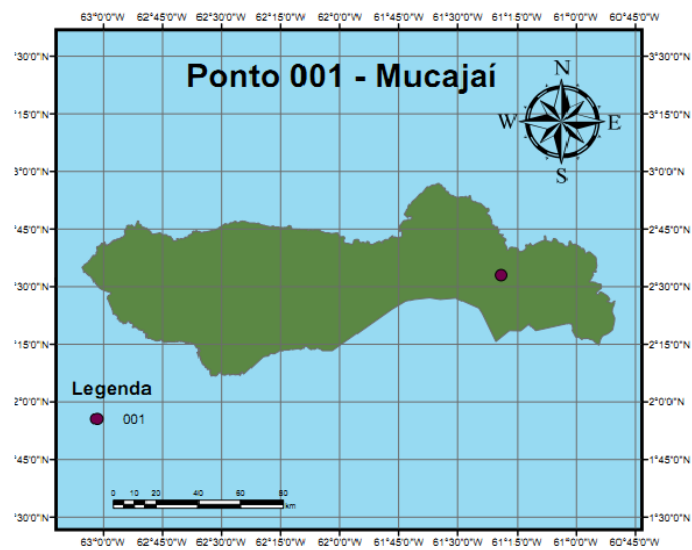
Figura 9 - Indivíduo no qual foi realizada a coleta a) aspecto geral; b) ramo com frutos; c) parte do tronco



Fonte: Do autor (2011)

O indivíduo foi georreferenciado através de GPS (*Global Position System*), Garmin 60CSX, localizando-se à 61°11'52" W e 2°32'20" N (figura 10). Também foram coletadas amostras de material contendo frutos para herborização, as quais foram levadas para identificação no Herbário do INPA, Manaus-AM, onde encontram-se depositadas.

Figura 10 - Localização do indivíduo de *Geissospermum argenteum*



Fonte: Costa Filho, R. (2011).

Foram confeccionadas quatro exsicatas do indivíduo, medindo 29 x 42 cm, contendo folhas e frutos, sendo duas delas (figura 11) depositadas no INPA (Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus) sob número 240513 e identificadas neste herbário por José Ramos, técnico em botânica do herbário do INPA.

Figura 11- Exsicata de *Geissospermum argenteum*



Fonte: Do autor (2011)

3.4 COLETA E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

As coletas de ambas as espécies seguiram os mesmos critérios, observando-se a qualidade do material, uma vez que este deve ser saudável, isto é, sem parasitas, fungos ou outros contaminantes. O material foi previamente selecionado no campo e acondicionado em sacos para sua preservação durante o transporte.

No Laboratório de Substâncias Bioativas do CCBio (Centro de Ciências Biológicas) da UFRR, todo material coletado foi higienizado separadamente com água, seguido de secagem em temperatura ambiente por uma noite. Em seguida, o material foi pesado e acondicionado em envelopes de cartolina, os quais foram identificados e levados para a estufa Tecnal TE 394/3 com circulação e renovação de ar em temperatura de 45°C, localizada no laboratório do PRONAT, na UFRR, onde permaneceu até atingir peso constante (figura 12).

Figura 12 - Estufa com circulação e renovação de ar (a); secagem das amostras em estufa de circulação de ar (b)



Fonte: Do autor (2011)

Após a secagem e pesagem do material, o mesmo foi triturado em moinho elétrico de facas tipo Willye da Tecnal, no laboratório do Centro de Ciências Agrárias da UFRR, localizado no Campus Cauamé (figura 13). Folhas, galhos e cascas foram cortados em partes menores para serem triturados separadamente, sendo o moinho higienizado após a trituração de cada tipo de material. As serragens obtidas foram acondicionadas em sacos plásticos, os quais foram identificados, fechados para

evitar hidratação e contaminação. O material foi armazenado em caixa para o transporte, evitando também a incidência direta de luz.

Figura 13 - Moinho de facas (a); serragem após moagem (b)



Fonte: Do autor (2011)

As amostras de ambas as espécies tiveram suas massas monitoradas durante todo o processo, da chegada ao laboratório (pós-coleta) até após a moagem e as massas estão descritas nas tabelas 3 e 4.

Tabela 3 - Massa das amostras de *G. argenteum* da coleta, após secagem e depois da moagem

Parte da Planta	Pós-coleta	Pós-secagem	Pós-moagem
Folha	718,75g	369,90g	376,85g
Galho	952,55 g	615,20g	610,85g
Casca	718,70 g	487,00g	482,55g

Fonte: Do autor (2011)

Tabela 4 - Massa de amostras de *M. guianensis* da coleta, após secagem em estufa e depois da moagem

Parte da planta	Pós-coleta (g)	Pós-seacagem (g)	Pós-moagem (g)
Cascas	1418,5	880,7	878,5
Folhas	835,7	287,9	287,2
Galhos	311,0	127,6	114,0

Fonte: Do autor (2011)

3.5 EXTRAÇÃO

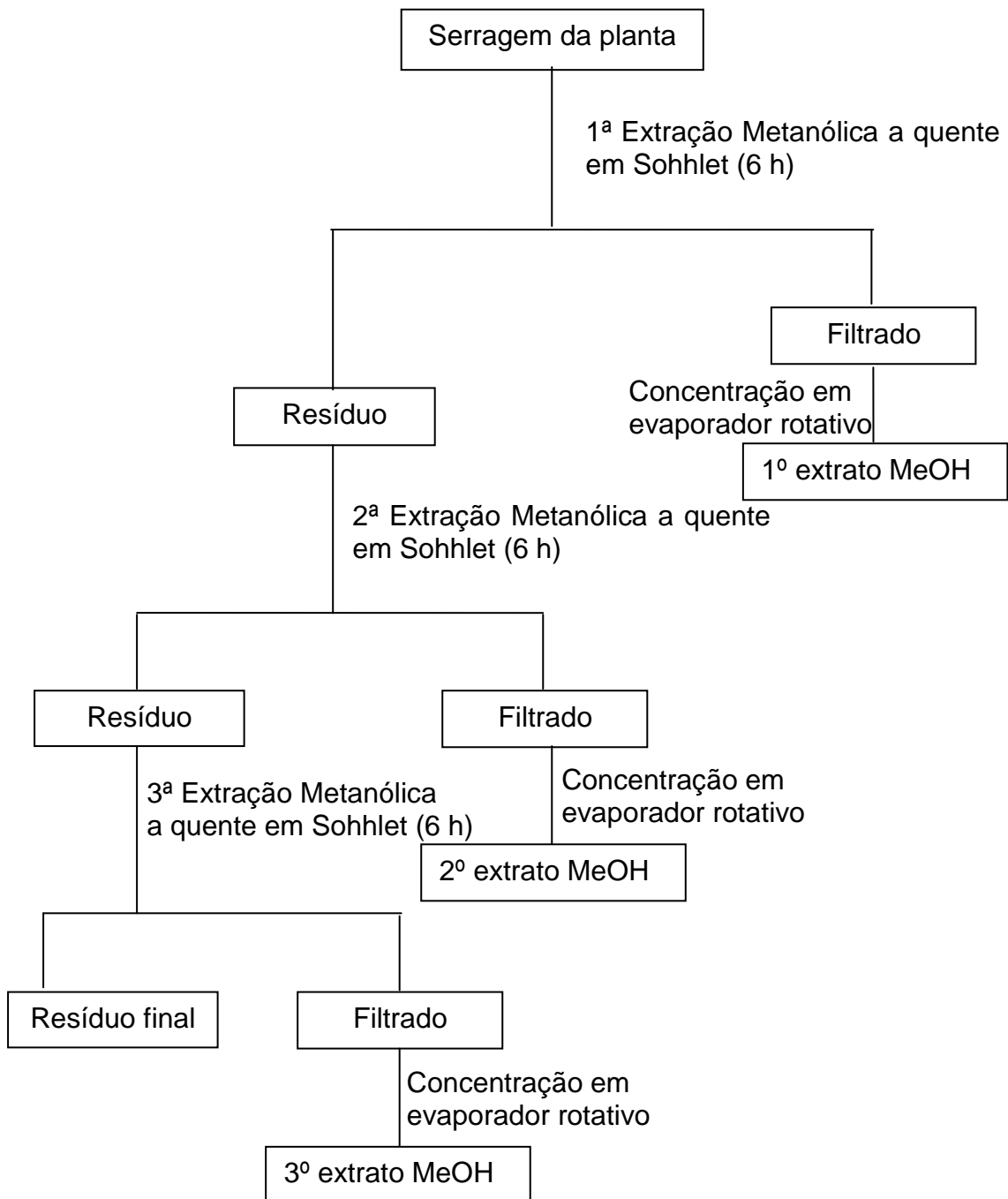
Os processos de extração foram realizados no Laboratório de Princípios Ativos da Amazônia (LAPAAM) do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA) em Manaus, sendo feitas as seguintes extrações: extração metanólica (MeOH) a quente e extração aquosa através de infusão.

3.5.1 Preparação do extrato metanólico

Na preparação dos extratos metanólicos foi utilizado o mesmo procedimento, apresentado através de fluxograma (figura 14) para ambas as espécies de plantas coletadas.

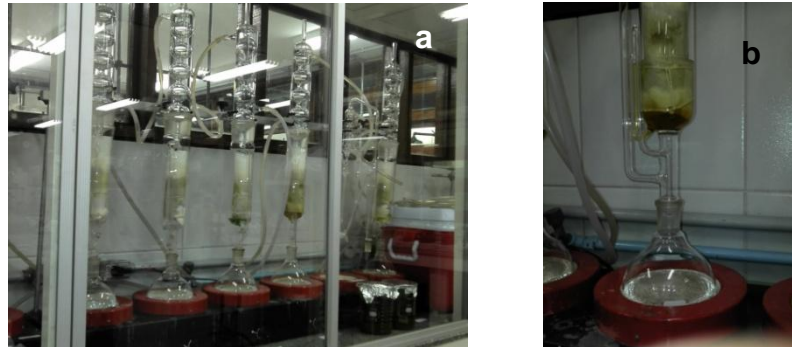
A extração a quente foi feita em aparelho Soxhlet (figura 15), utilizando como solvente o metanol (MeOH). As amostras foram pesadas em copos feitos com papel de filtro adequados ao Soxhlet. A extração foi realizada em três ciclos contínuos de 6 horas, sendo que ao final de cada ciclo, o balão foi retirado para a troca de solvente.

Figura 14 - Fluxograma das extrações metanólicas (processo repetido para cascas, folhas e galhos de *Minquartia guianensis* e *Geissospermum argenteum*)



Fonte: Do autor (2011).

Figura 15 - Conjunto de aparelhos Soxhlet do LAPAAM (a); extração em andamento (b)



Fonte: Do autor (2011)

Após cada ciclo de 6 horas, os extratos foram filtrados e concentrados sob pressão reduzida no evaporador rotativo Fisatom 802, modelo 550 (figura 16), a uma temperatura de banho de aproximadamente 45 °C. Na concentração dos extratos, o solvente utilizado (MeOH) foi recuperado e reutilizado após tratamento. Assim foram obtidos três extratos metanólicos: de folhas, galhos e cascas.

Após a concentração, os extratos foram transferidos para frascos previamente pesados e para a eliminação completa do solvente, foram colocados para secar em bandejas dispostas sobre areia aquecida à temperatura de aproximadamente 37° C, dentro de uma capela. Posteriormente, para a obtenção da massa do extrato, foram novamente pesados e congelados.

Figura 16 - Evaporador rotativo utilizado na concentração dos extratos



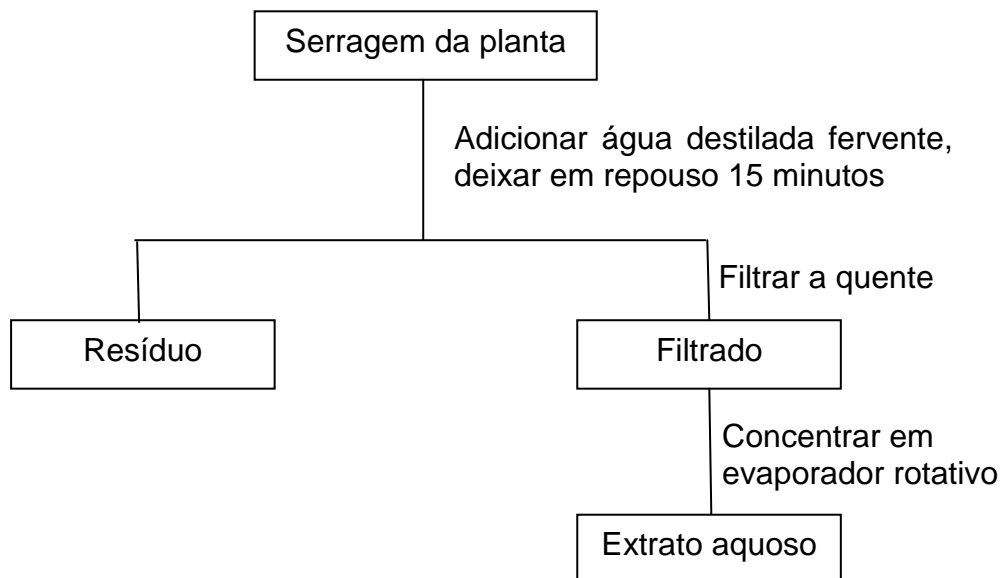
Fonte: Do autor (2011).

3.5.2 Preparação do extrato aquoso

O extrato aquoso foi preparado através de infusão (figura 17). Para este procedimento, foi pesado cerca de 15% do total de serragem de cada tipo de amostra, ao qual foi adicionada água destilada, previamente submetida ao aquecimento até a ebulição.

A mistura permaneceu em repouso por 15 minutos, sendo filtrada à quente após esse tempo. As soluções obtidas após a filtração passaram por evaporação sob pressão reduzida em evaporador rotativo e os extratos resultantes foram transferidos para frascos previamente etiquetados e pesados. Os frascos foram colocados em bandeja aquecida dentro de capela até estarem livres do solvente (água). Depois de secos, os extratos foram pesados e congelados até o momento da utilização.

Figura 17 - Fluxograma da infusão para cascas, folhas e galhos de *Minquartia guianensis* e *Geissospermum argenteum*



Fonte: Do autor (2011).

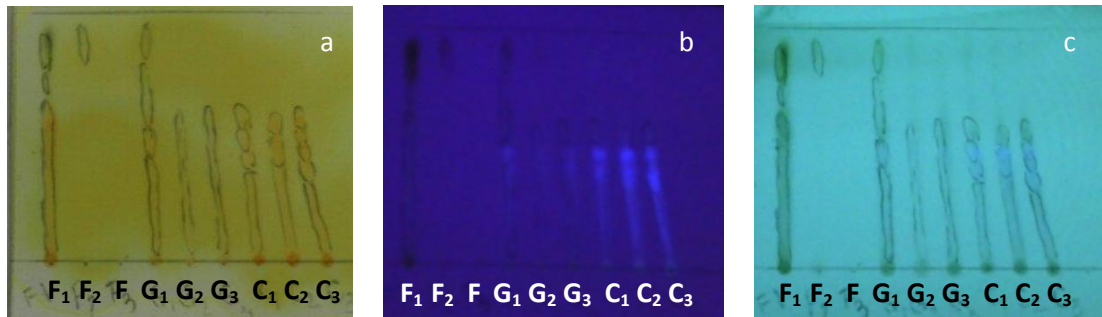
3.6 PARTIÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DO EXTRATO METANÓLICO DE CASCAS DE *G. argenteum* WOODSON

Os extratos metanólicos e aquosos de cascas, folhas e galhos foram submetidos à cromatografia de camada delgada (CCD). A cromatografia é um método físico-químico utilizado para a separação de componentes de uma mistura, baseado no princípio da adsorção seletiva (COLLINS; 2006).

A cromatografia em camada delgada consiste na separação dos componentes de uma mistura através da migração diferencial sobre uma camada delgada de adsorvente retido sobre uma superfície plana. Pequenas gotas de solução das amostras foram aplicadas com capilar a 0,5 cm do extremo inferior da placa. Após a aplicação esperou-se a volatilização do solvente e, posteriormente a placa foi colocada em um recipiente contendo a fase móvel (solvente ou mistura de solventes). Como somente a base da placa fica submersa, o solvente começa a molhar a fase estacionária e sob por capilaridade (LOPES, 2006). A CCD é uma técnica importante para seleção dos solventes ou mistura destes mais adequados para determinada amostra, além de ser empregada no monitoramento das separações.

As CCDs foram reveladas com Dragendorff, específico para alcalóides, ultravioleta 254 nm (revelador de dupla ligação não conjugada) e 366 nm (ligação dupla conjugada), vapor de iodo (dupla ligação em geral) e *para*-anisaldeído, revelador universal (figura 18). A CCD foi positiva para alcalóides (Dragendorff: cor laranja). Como as pesquisas já realizadas com *Geissospermum* ssp. priorizaram a casca em suas análises, seguiu-se neste caminho selecionando-se o extrato bruto metanólico para a realização da partição líquido-líquido, utilizando uma cascata de polaridade crescente de solventes (hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol/água).

Figura 18 - CCDs de extratos brutos metanólicos de folhas (F_1 - 1ª extração, F_2 - 2ª extração, F_3 - 3ª extração), galhos (G_1 - 1ª extração, G_2 - 2ª extração, G_3 - 3ª extração) e cascas (C_1 - 1ª extração, C_2 - 2ª extração, C_3 - 3ª extração) revelados com Dragendorff (a), UV 366 (b), UV254 (c)

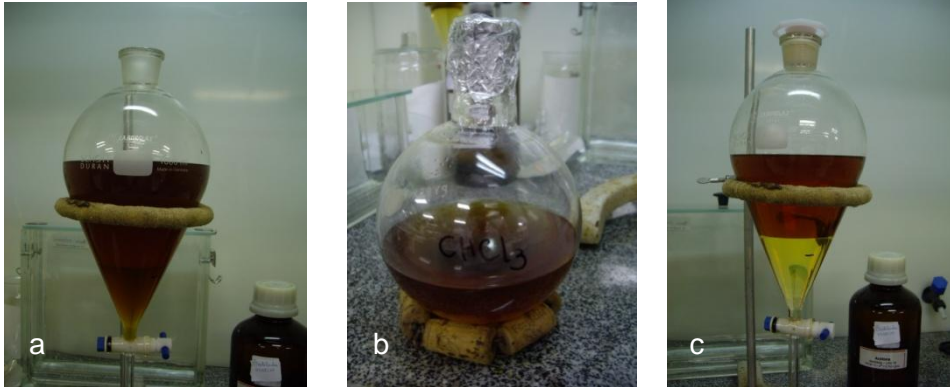


Fonte: Do autor (2011).

O extrato metanólico obtido de cascas de *G. argenteum* foi submetido a uma partição líquido-líquido (figura 19), utilizando-se 10,40 g de amostra, que foi dissolvida em 500 mL de solução metanol: água (7:3) em funil de separação de 1000 mL. A esta solução foi acrescentado 150 mL de hexano e procedeu-se a extração com agitação vigorosa para a boa mistura das fases. A mistura foi deixada em repouso para a separação das fases e a fase hexânica foi recolhida em um balão. A extração com hexano foi repetida mais duas vezes por um total de três extrações.

Separada a fração hexânica adicionou-se água destilada à fração metanol/água, para que esta atingisse a proporção 7:3 (metanol: água). Em seguida a partição foi feita com clorofórmio (3 x 150 mL) separando as fases clorofórmicas em outro balão e por último acrescentou-se acetato de etila (três vezes de 150 mL), resultando a fase acetato de etila. No funil de separação ficou a fase metanol/água, que também foi transferida para um balão.

Figura 19 - Partição líquido-líquido: a - fases metanol/água e clorofórmio; b - fase clorofórmica recolhida em balão; c - fases hidroalcoólica e acetato de etila em funil de separação



Fonte: Do autor (2011).

3.6.1 Análise das frações de *G. argenteum* por CCD

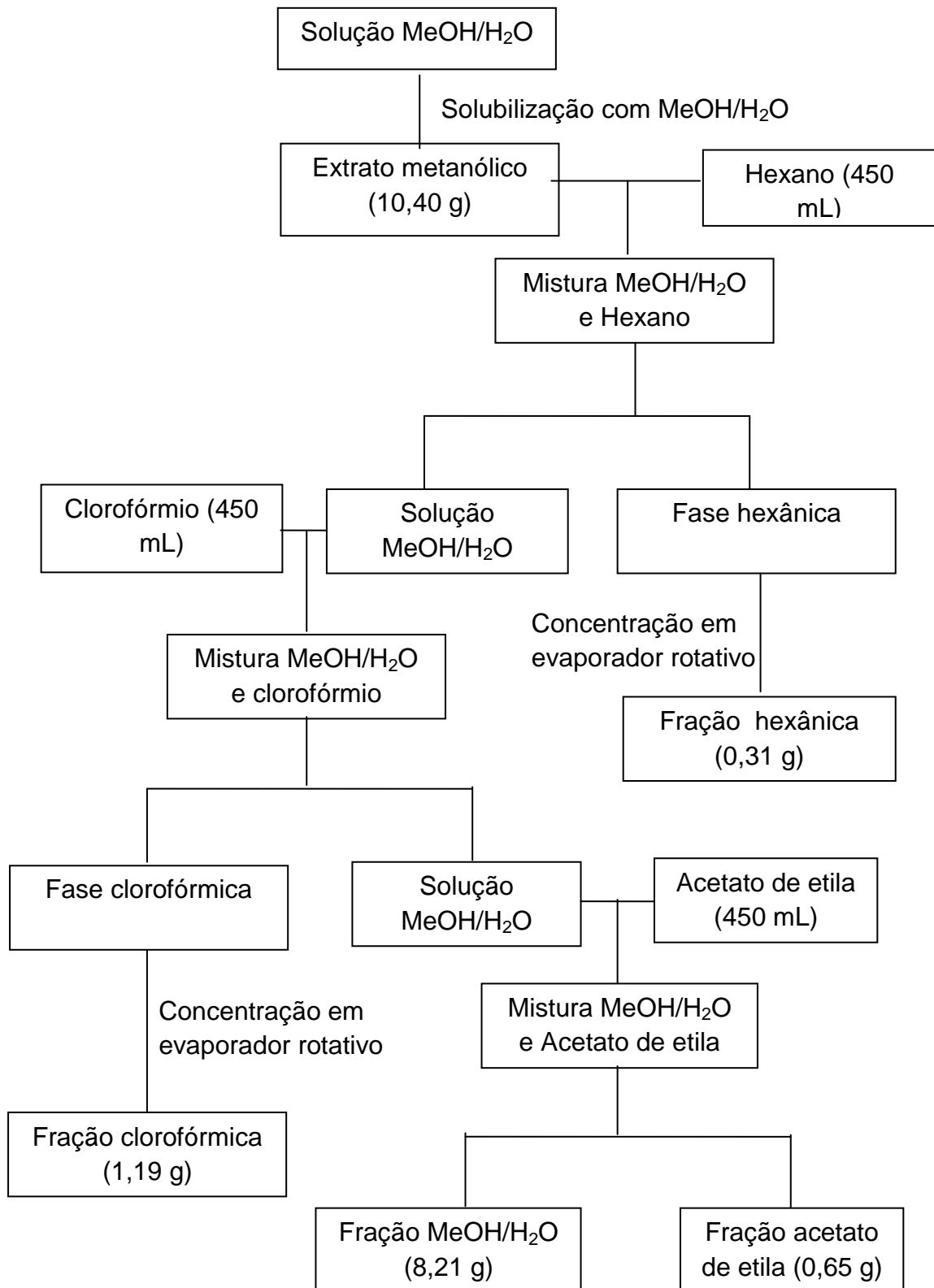
As fases resultantes do processo de partição líquido-líquido (figura 20) foram concentradas através de evaporação a vácuo e as massas medidas após a volatilização dos solventes estão descritas na tabela 5.

Tabela 5 - Frações obtidas por particionamento de 10,4 g de extrato metanólico de casca de *G. argenteum*

Fração	Código	Extrato (g)
Hexânica	GAPH	0,31
Clorofórmica	GAPC	1,19
Acetato de etila	GAPA	0,65
Metanol/água	GAPM	8,21

Fonte: Do autor (2011).

Figura 20 - Fluxograma da partição líquido-líquido do extrato metanólico das cascas de *G. argenteum*



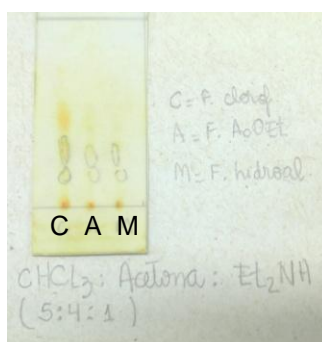
Fonte: Do autor (2011)

Foram realizadas CCDs para análise das frações hexânica, clorofórmica, acetato de etila e metanol/água utilizando diversos sistemas de eluentes a fim de encontrar um sistema ideal para separação cromatográfica de substâncias ou grupo de substâncias. Sistemas eluentes utilizados: CHCl_3 : MeOH (95:5; 90:10; 80:20), AcOEt: MeOH (90:10), CHCl_3 : Acetona (90:10), AcOEt: MeOH: H_2O (8: 1: 1), CHCl_3 : EtOH (90:10), CHCl_3 : Acetona: MeOH (50: 30: 20), CHCl_3 : Isopropanol (90: 10), DCM: MeOH (90: 10), AcOEt: MeOH (85: 15; 80: 20; 75: 25; 70: 30; 65: 35; 60: 40; 50: 50), AcOEt: MeOH: Ácido Acético Glacial (70: 30: 2 gotas), CHCl_3 : MeOH: NH_4OH 10% (64: 32: 1,20), CHCl_3 : MeOH: NH_4OH 10% (64: 32: 0,6), CHCl_3 : Acetona: Et_2NH (50: 40: 10), CHCl_3 : Acetona: Et_2NH (50: 45: 5), CHCl_3 : MeOH: Et_2NH (70: 20: 10), CHCl_3 : MeOH: NH_4OH 10% (80: 20: 5 μL), CHCl_3 : MeOH: NH_4OH 10% (85: 15: 10 μL), CHCl_3 : Acetona: Et_2NH (99: 1: 0,1), Acetona: Et_2NH (99: 1: 0,25), Acetona: Et_2NH (99: 1: 0,3), Acetona: Et_2NH (99: 1: 0,5), Acetona: Et_2NH (90: 10: 0,5). Todas as CCDs foram analisadas em luz ultravioleta 254 e 366 nm, vapor de iodo, *para*-anisaldeído e Dragendorff.

3.7 FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DA FASE CLOROFÓRMICA DE CASCA DE *G. argenteum* WOODSON

Para a coluna cromatográfica selecionou-se, através das análises de CCDs, a fração clorofórmica, pois a mesma apresentou alcalóides com maior intensidade (figura 21).

Figura 21: CCD das frações clorofórmica (C), Acetato de etila (A) e hidroalcoólica (M) reveladas com Dragendorff e eluídas com CHCl_3 : Acetona: Et_2NH (5:4:1)



Fonte: Do autor (2011).

A coluna utilizada foi de 3,2 x 60 (\varnothing x h) e sílica gel 60 flash (0,040 x 0,063 mm) da Merck, previamente ativada a uma temperatura de 100° C por 4 horas. A coluna foi empacotada utilizando-se o método molhado com 500 mL do sistema de eluentes: CHCl_3 : acetona: Et_2NH (99: 1: 0,1), sendo que a altura da coluna foi de 40 cm. Empacotada a coluna foi feita a disposição da sílica impregnada com (figura 22) 1,19 g de amostra dissolvida em metanol, em aquecedor Fisatom a uma temperatura de 50° C. Na cromatografia em coluna foram utilizados os sistemas de eluentes conforme a tabela 3.

Figura 22 - Preparo da sílica impregnada com amostra para a coluna cromatográfica



Fonte: Do autor (2011).

Tabela 6 - Sistema de eluentes utilizados na coluna cromatográfica gradiente

Sistema	Volume (mL)	Proporção
CHCl_3 : Acetona: Et_2NH	500	99: 1: 3
CHCl_3 : Acetona: Et_2NH	500	99: 1: 5
CHCl_3 : Acetona: Et_2NH	250	90: 10: 5
CHCl_3 : Acetona: Et_2NH	250	50: 50: 5
CHCl_3 : MeOH: NH_4OH concentrado	300	80: 20: 0,05
CHCl_3 : MeOH: NH_4OH 10 %	200	50: 50: 1,2
MeOH: NH_4OH 10 %	200	100: 1,2
MeOH: NH_4OH 10 %	100	100: 4
MeOH: NH_4OH 10 %	100	100: 8

Fonte: Do autor (2011).

Após o início da corrida cromatográfica (figura 23) foram recolhidas 38 frações de aproximadamente 50 mL cada.

Figura 23: Coluna cromatográfica (a – disposição do extrato na coluna; b – visão geral da coluna gradiente)



Fonte: Do autor (2011).

As frações obtidas foram concentradas e transferidas para frascos previamente etiquetados com o código da fração e pesados e suas massas estão relacionadas na tabela 7. As mesmas frações também analisadas através de CCDs as quais foram reveladas por UV 254 nm, 366nm, vapor de Iodo, *para*-anisaldeído e Dragendorff.

Tabela 7 - Frações obtidas da fração clorofórmica (1,19 g) através de fracionamento cromatográfico em coluna

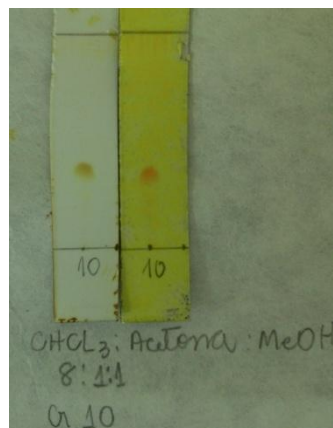
Código	Amostra (g)	Amostra (mg)
Cr01	0,0153	15,30
Cr02	0,0180	18,00
Cr03	0,0093	9,30
Cr04	0,0101	10,10
Cr05	0,0067	6,70
Cr06	0,0116	11,60
Cr07	0,0140	14,00
Cr08	0,0117	11,70
Cr09	0,0070	7,00
Cr10	0,0077	7,70
Cr11	0,0180	18,00
Cr12	0,0205	20,50
Cr13	0,0134	13,40
Cr14	0,0099	9,90
Cr15	0,0084	8,40
Cr16	0,0076	7,60
Cr17	0,0064	6,40
Cr18	0,0076	7,60
Cr19	0,0039	3,90
Cr20	0,0060	6,00
Cr21	0,0031	3,10
Cr22	0,0112	11,20
Cr23	0,0143	14,30
Cr24	0,0178	17,80
Cr25	0,0015	1,50
Cr26	0,0104	10,40
Cr27	0,0400	40,00
Cr28	0,1412	141,20
Cr29	0,0975	97,50
Cr30	0,0725	72,50
Cr31	0,0799	79,90
Cr32	0,0427	42,70
Cr33	0,0219	21,90
Cr34	0,0863	86,30
Cr35	0,0066	6,60
Cr36	0,0443	44,30
Cr37	0,0800	80,00
Cr38	0,1152	115,20
Total	1,0995	1099,50

Fonte: Do autor (2011).

3.8 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA PREPARATIVA NA FRAÇÃO CR10 DA COLUNA CROMATOGRÁFICA

A fração Cr10 foi selecionada para a cromatografia preparativa, pois a mesma apresentou melhor perfil para alcalóides nas CCDs realizadas com o sistema CHCl_3 : Acetona: MeOH, na proporção 80:10:10 (figura 24). A cromatografia preparativa foi realizada em placa de vidro de 20 x 20 cm, sobre a qual foi disposta uma camada de sílica gel (15 g) dissolvida em água destilada. Após a secagem a placa foi ativada em estufa a 100° C. A amostra Cr10 (7,7 mg) foi dissolvida em metanol em banho de ultra-som e aplicada em sua totalidade na placa de sílica gel com o auxílio de um capilar a uma distância de 1,5 cm da base e 0,5 cm das laterais, sendo que foi aplicado também um ponto de referência para ser revelado com reagente químico, indicador de alcalóides (Dragendorff). Finalizada a aplicação, a placa permaneceu em repouso para a evaporação do solvente.

Figura 24 - Fração 10 da coluna cromatográfica revelada com vapor de iodo e Dragendorff, respectivamente

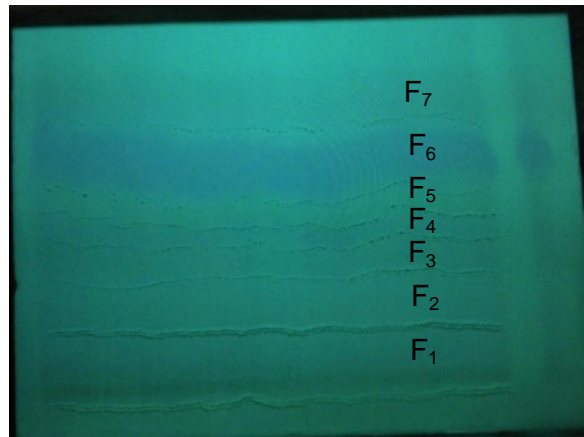


Fonte: Do autor (2011).

Na eluição da placa cromatográfica foram utilizados 150 mL do sistema CHCl_3 : acetona: MeOH (80:10:10) o qual foi colocado numa cuba de vidro com tampa e papel de filtro. A placa de cromatografia preparativa foi colocada verticalmente na cuba para que ocorresse a eluição e ao final desta, a placa foi retirada cuidadosamente, seca à temperatura ambiente e analisada em luz UV 254

nm e 366 nm. Através da observação da fluorescência em UV 254 nm foram demarcadas as faixas F₁, F₂, F₃, F₄, F₅, F₆ e F₇ (figura 25).

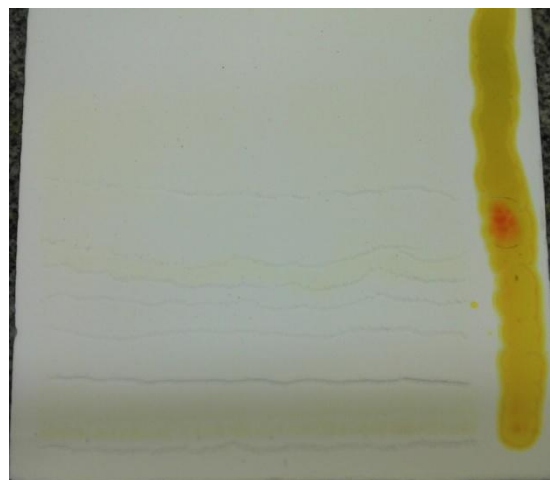
Figura 25: Cromatografia preparativa revelada em UV 254 nm. Faixas observadas: F₁, F₂, F₃, F₄, F₅, F₆ e F₇



Fonte: Do autor (2011).

A amostra de referência foi revelada com Dragendorff, sendo que a faixa 6 apresentou-se positiva para alcalóides (figura 26).

Figura 26: Placa de CCD preparativa da fração Cr10 revelada com Dragendorff



Fonte: Do autor (2011).

Cada uma das frações da placa foi transferida separadamente para um béquer por raspagem com espátula. Ao béquer foi adicionado acetato de etila para extrair a amostra impregnada na sílica. Em seguida a mistura foi filtrada em algodão, e o filtrado foi posteriormente concentrado em rotaevaporador e transferido para frasco previamente etiquetado e pesado e suas massas estão descritas na tabela 8.

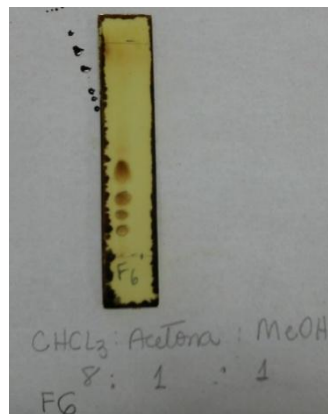
Tabela 8 - Massas das frações obtidas através de CCD – P

	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7
Massa (mg)	0,8	1,1	0,8	0,5	1,2	1,1	1.9

Fonte: Do autor (2011).

Nas frações resultantes da cromatografia preparativa também foram realizadas CCDs. A CCD da fração 6 apresentou 4 manchas reveladas por UV 254 nm, 366 nm, vapor de iodo (figura 27) e Dragendorff.

Figura 27 - F6 revelada com vapor de iodo



Fonte: Do autor. (2011).

3.9 ENSAIOS BIOLÓGICOS

A atividade biológica dos extratos brutos e frações foi avaliada para *Plasmodium falciparum*, parasita causador da malária em humanos, e também para

atividade antibacteriana, contra *E. coli*, *S. aureus* e *S. mutans* e antifúngica contra *C. albicans*.

3.9.1 Atividade antimalárica *in vitro*

Os diferentes extratos obtidos foram testados quanto à atividade antimalárica no laboratório da Gerência da Malária da Fundação de Medicina Tropical do Amazonas (FTM – AM) em colaboração com o INPA, sob a responsabilidade do professor Luiz Francisco Rocha e Silva. Nos testes foi utilizada a cepa cloroquino-resistente, K1, de *P. falciparum*. O método utilizado para o cultivo foi introduzido por Trager e Jensen (1976) baseado nas fases eritrocitárias do parasito, com algumas adaptações. Segundo Deharo e colaboradores (2000) este método revolucionou a pesquisa sobre a malária, e está baseado no conhecimento do ciclo eritrocitário do parasito, no meio de cultura RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*), no cultivo contínuo e na redução da tensão de oxigênio – O₂ (2-10%) e aumento do gás carbônico – CO₂ (3-5%).

Para os testes, a cepa K1 (MRA-159) de *P. falciparum* foi adquirida junto ao *Malaria Research and Reference Reagent Resource Center* (MR4) localizado em Manassas, Virginia, EUA e mantida em hemácias humanas do grupo sanguíneo A⁺ e preservada em nitrogênio líquido (criopreservação).

Todos os procedimentos para o cultivo de *P. falciparum* foram realizados em câmara de fluxo laminar com total assepsia. A cepa K1 foi descongelada utilizando três centrifugações, com soluções fisiológicas em concentrações decrescentes (NaCl 12 %, NaCl 1,6 % e NaCl 0,9 %) e transferida para a garrafa de poliestireno de 25 mL com 4,5 mL de meio de cultura RPMI 1640 do laboratório Sigma, suplementado com 10 % plasma humano inativado, ao qual foi acrescentada 300 µL de hemácias não-parasitadas de tipo sanguíneo A⁺ e uma mistura de gases composta de 3 % O₂, 5 % CO₂ e 92 % N₂ por 60 s e mantida em cultivo contínuo.

A garrafa de cultivo foi incubada em estufa a 37 °C por 48 h e ao final deste período o meio de cultura foi retirado e foram preparados esfregaços para fazer a contagem dos parasitos. Os esfregaços foram corados com o Panótico Rápido LB da Laborclin (figura 28). Após a coloração, a lâmina foi observada em microscópio óptico, com objetiva de 100x para verificar a parasitemia. O cultivo contínuo foi

mantido através de trocas diárias de meio RPMI 1640, suplementado com plasma humano, até que a parasitemia atingisse valores entre 1,5 e 2,5 %.

Figura 28 - Esfregaço sanguíneo corado

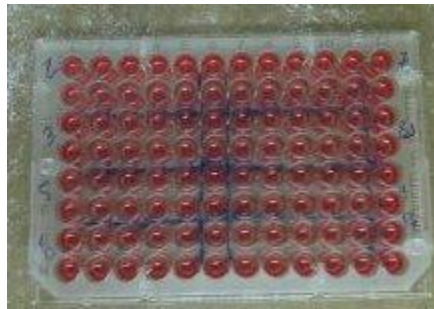


Fonte: Do autor (2011).

Como a parasitemia do cultivo foi elevada, procedeu-se o split, isto é, o volume da garrafa de cultivo foi dividido e mais hemácias não-parasitadas foram adicionadas, de tal forma que a parasitemia ficasse entre 0,5 a 1%. A parasitemia foi calculada em percentual de formas eritrocíticas viáveis observadas durante a contagem de cerca de 2000 hemácias.

Para a realização dos testes, os parasitos foram sincronizados no estágio de trofozoítos utilizando uma solução D-sorbitol (LAMBROS; VANDERBERG, 1979) e foram novamente cultivados até que atingissem 1 a 2 % de parasitemia e 2,5 % de hematócrito.

Os testes de atividade antimalárica *in vitro* foram realizados em placas estéreis, contendo 96 poços (figura 29) e para isso foram pesados cerca de 1 mg/mL de cada extrato em tubos eppendorf, os quais foram diluídos com volumes previamente calculados de dimetilsulfóxido (DMSO), com 0,02 % de concentração final deste último. Os extratos testados foram descritos no layout da placa para teste *in vitro* (anexo A).

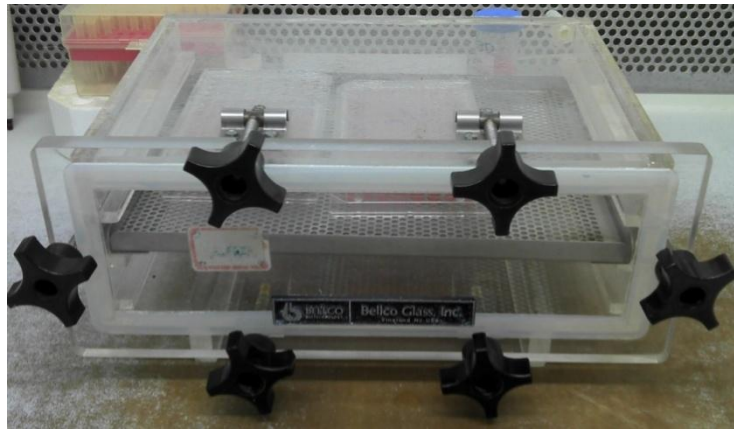
Figura 29 - Teste antimalárico *in vitro*

Fonte: Do autor (2011).

Os extratos metanólicos (MeOH) foram dissolvidos em DMSO e os aquosos diretamente no meio de cultura RPMI1640 com auxílio de um banho de ultrassom por aproximadamente 10 minutos. Também foram feitos controles negativos nos quais foram utilizados DMSO 1 %, diluindo-se 20 μL de DMSO concentrado em 1980 μL do mesmo meio de cultura. Para controle positivo foi utilizada a cloroquina (CI_{50} 0,2 μg).

Para o *screening* inicial de amostras para a atividade antimalárica na placa de teste, foram colocados 20 μL em cada poço dos extratos preparados em duas concentrações, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, e cada concentração em triplicata, controles positivo (cloroquina) e negativo, todos os poços receberam 180 μL de hemácias parasitadas com 1 a 2% de parasitemia e 2,5% de hematócrito e esta foi incubada em ambiente de 3% - O_2 (oxigênio), 5% - CO_2 (gás carbônico), 92% - N_2 (nitrogênio) (figura 30) e posteriormente, colocada em estufa 37°C por 24 horas.

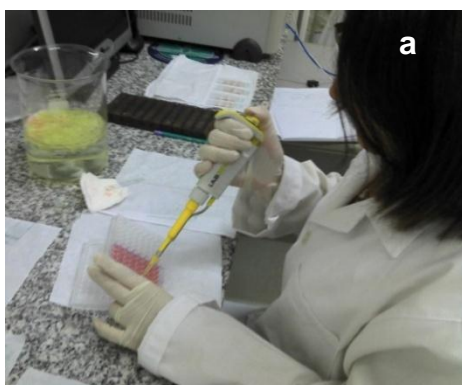
Figura 30 - Cuba com 3% de O₂, 5% de CO₂ e 92% de N₂



Fonte: Do autor (2011).

Após 48 h a placa de teste foi retirada da estufa. Com auxílio de uma pipeta automática, foi retirado o solvente de cada poço, deixando nele apenas hemácias que foram transferidas para uma lâmina, na qual foi realizado o esfregaço sanguíneo (figura 31).

Figura 31 - Preparo das lâminas do teste antimalárico *in vitro* (a). Extensões sanguíneas antes da coloração (b)



Fonte: Do autor (2011).

A parasitemia (%) de cada poço foi determinada através de leitura da extensão sanguínea (do esfregaço), em microscópio óptico, com objetiva de 100 x. As lâminas contendo os esfregaços foram codificadas para evitar que a leitura fosse

tendenciosa (*blind*). Foram lidos 10 campos com aproximadamente 200 hemácias cada campo, na porção central do esfregaço, onde as hemácias se encontravam distribuídas de forma homogênea. Nos campos foram feitas as contagens de hemácias e os parasitos nessas últimas foram caracterizados utilizando-se a nomenclatura:

An para parasitos na forma de anel,

Tf para parasita na forma trofozoíto,

Eq para parasita na forma esquizonte e

H para hemácias não parasitadas.

Os resultados foram anotados nas planilhas para contagens (anexo B) e a parasitemia de cada esfregaço foi calculada conforme a fórmula abaixo:

$$\text{Parasitemia (\%)} = 100 \times \frac{\text{n}^\circ \text{ de hemácias parasitadas}}{\text{n}^\circ \text{ total de hemácias}}$$

Como os testes foram feitos em triplicata, foi calculada a média das 3 repetições de cada teste e controles, negativo (DMSO) e positivo (cloroquina). A inibição do parasita também foi expressa em percentual de acordo com o seguinte cálculo:

$$\text{Inibição (\%)} = 100 \times (1 - \frac{\text{média da parasitemia extrato}}{\text{média da parasitemia controle}})$$

Como critério da atividade *in vitro* estabeleceu-se que os extratos ou frações, que inibissem de 80 a 100 % do crescimento dos parasitos seriam consideradas ativas, parcialmente ativas para inibição entre 50 e 79 % e inativas para inibição menor que 50 %, na concentração mais alta testada (50 µg/mL).

3.9.1.1 Determinação de CI_{50}

Os extratos ativos no screening inicial foram testados novamente em diferentes concentrações para determinar a concentração do extrato necessária para inibir 50% do parasito. Para isso os extratos foram diluídos em DMSO na concentração estoque de 5 mg/mL, e posteriormente diluídos em meio completo

para obtenção de sete concentrações de que variaram entre 100 µg/mL e 0,13 µg/mL. O teste foi realizado como descrito por Andrade-Neto et al. (2004). As diluições das amostras foram aplicadas em poços de micro-placa contendo hemácias parasitadas. A placa foi incubada por 24 h a 37 °C. Após a incubação, o conteúdo dos poços foi avaliado através de microscopia óptica. Cada concentração foi testada em triplicata e a inibição do crescimento dos parasitos foi determinada pela comparação com os controles de crescimento sem amostra, segundo fórmula abaixo:

$$\% \text{ inibição} = \left(\frac{\text{parasitemia do controle} - \text{parasitemia com amostra}}{\text{parasitemia do controle}} \right) \times 100$$

Para a classificação da atividade adotou-se a que foi proposta por Bertani et. al. (2005) na qual:

$CI_{50} < 0,1 \mu\text{g/mL}$ = muito ativo (MA);

CI_{50} de 0,1 a 5 µg/mL = ativo (A);

CI_{50} de 5 a 10 µg/mL = atividade moderada (AM);

$CI_{50} > 11 \mu\text{g/mL}$ = inativo (I).

3.9.2 Atividade antimicrobiana

Para os testes de atividade antibacteriana foram utilizadas as seguintes bactérias: Gram positiva (*Streptococcus mutans* Clarke, 1924, CBAM - Coleção de Bactérias da Amazônia da Fiocruz – 241 e *Staphylococcus aureus* Rosenbach, 1884, ATCC 25923), Gram negativa (*Escherichia coli* Theodor Escherich, 1885, CBAM 001) e para atividade antifúngica utilizou-se a levedura *Candida albicans* Berkh. 1923, ATCC 10231.

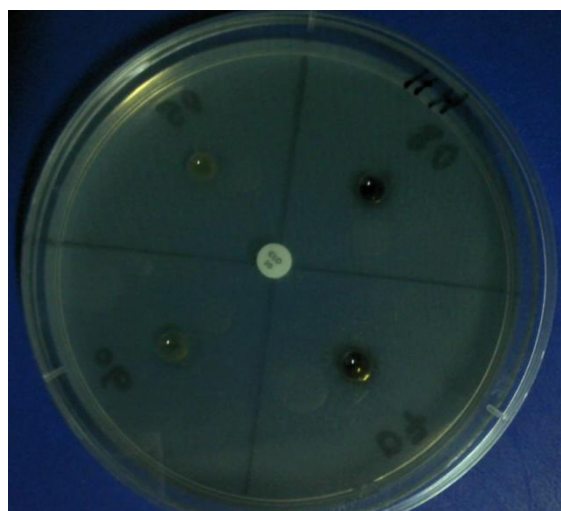
3.9.2.1 Método da difusão em ágar

As análises da atividade antimicrobiana foram realizadas no laboratório de micologia do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Amazonas – UFAM e também no laboratório de microbiologia da Universidade Federal de Roraima – UFRR, utilizando o método de difusão em ágar, método

introduzido por Kirby-Bauer (BAUER et al., 1966) baseado na inibição do crescimento de micro-organismos na superfície do meio de cultura inoculado com o micro-organismo a ser testado pelos extratos preparados nas concentrações de 10 mg/mL. Neste ensaio foi utilizado como controle positivo o cloranfenicol para bactérias e itraconazol para levedura e como controle negativo o diluente, DMSO e foram realizados em triplicata.

O meio de cultura utilizado foi o ágar de Müller Hinton (25 mL distribuídos em placas de 9 mm) para cepas bacterianas e Sabouraud, para leveduras. A suspensão microbiana foi preparada colocando-se colônias da cultura em 10 mL de água destilada esterilizada, ajustando a suspensão, por comparação, para a densidade do tubo 1 da escala de McFarland. As placas contendo ágar de Müller Hinton e Sabouraud foram inoculadas com o auxílio de um “swab” esterilizado 100 µL de inóculo que foi espalhado homogeneamente na superfície do meio. Após a absorção por 10 min, o ágar foi perfurado resultando em cavidades com 6 mm de diâmetro (5 por placa), as quais foram preenchidas com 50 µL de extratos e frações previamente dissolvidos em DMSO na concentração de 10 mg/mL (figura 32). As placas permaneceram em repouso até a evaporação do diluente DMSO (37 °C) e incubadas em estufa a 37 °C por 24/48 h (CARNEIRO et al., 2008).

Figura 32 - Teste antimicrobiano através de difusão com perfuração do ágar



Fonte: Do autor (2011).

Após o período de incubação, extratos ativos foram caracterizados por terem um halo de inibição do crescimento da bactéria ou fungo em volta do poço no ágar. A atividade do extrato foi avaliada medindo-se o diâmetro do halo de inibição com uma régua milimetrada. Os extratos foram classificados de acordo com o diâmetro da inibição do crescimento em:

I – inativos, halo < 9 mm;

PA – parcialmente ativos, halo = 9 – 12 mm;

A – ativos, halo = 13 -18 mm;

MA – muito ativos, halo > 18 mm.

Esse critério é utilizado por outros na avaliação da atividade antimicrobiana (ALVES et al., 2000).

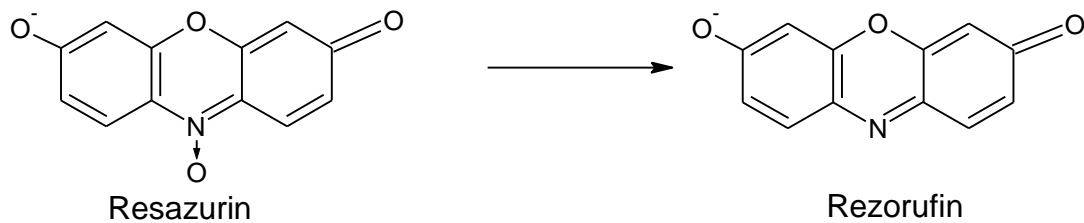
3.9.2.2 Concentração inibitória mínima (CIM)

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada pela técnica da micro diluição em placa de noventa e seis poços, utilizando caldo de Mueller Hinton para as bactérias *E. coli*, *S. aureus*, *S. mutans* e caldo Sabouraud para a levedura *C. albicans*.

Neste teste pipetou-se 100 µL de meio de cultura, selecionado de acordo com o micro-organismo em todos os poços da placa. No primeiro poço foi acrescentado 100 µL do extrato, fazendo-se em seguida uma diluição seriada. A esta solução foi acrescentada a suspensão de microorganismos preparada de acordo com o tubo 1 da escala de McFarland. A placa foi fechada e incubada em estufa 37° C por 24 horas, enquanto que a placa com *C. albicans* permaneceu em temperatura ambiente pelo mesmo período. Decorrido este período, foi adicionado a cada poço 20 µL do reagente resazurin a 0,1%, o qual indica a inibição bacteriana através da coloração (azul = inibição microbiana; rosa = crescimento bacteriano), visto que o mesmo é um indicador de viabilidade e proliferação celular, isto é, a mudança de cor é decorrente da conversão do resazurin a resorufin (figura 33).

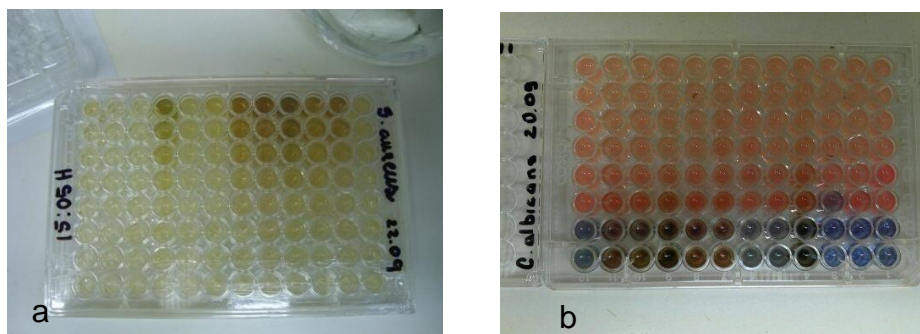
Na figura 34 observamos a diferença na coloração de uma placa de microdiluição antes da incubação (a) e outra após a incubação por 24 h em estufa 37 °C.

Figura 33 - Conversão do resazurin a resorufin



Fonte: Do autor (2011).

Figura 34 - CIM através de microdiluição em placa (a – placa antes da incubação; b – Após o tempo de incubação)



Fonte: Do autor (2011).

A concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como a menor concentração capaz de inibir o crescimento do micro-organismo, sendo que os extratos foram utilizados nas seguintes concentrações: 2,5 mg/ mL; 1,25 mg/ mL; 0,63 mg/ mL; 0,31 mg/ mL; 0,16 mg/ mL; 0,78 µg/ mL; 0,39 µg/ mL e 0,19 µg / mL.

3.9.2.3 Bioautografia

As frações obtidas de casca de *G. argenteum* foram aplicadas em placas para CCD, de sílica gel 60 F, GF₂₅₄, com 0,2 mm de espessura, 10 x 5 cm de tamanho, corridas em duplicata utilizando o sistema de solventes CHCl₃: Acetona: MeOH. Foi preparado um cromatograma de referência no qual as bandas foram visualizadas com luz UV 254 e 366 nm e com reagente revelador de Dragendorff, uma vez que os compostos de interesse eram os alcalóides.

Para a bioautografia, outro cromatograma foi colocado em uma placa estéril, e posteriormente coberta com ágar de Müller Hinton, contendo um inóculo de *S. aureus* preparado de acordo com tubo 1 da escala de McFarland e 1 mL de TTC (2,3,5 – triphenyltetrazolium chloride ou 2,3,5 – cloreto de trifeniltetrazólio), agente revelador. As placas de Petri foram incubadas em estufa 37° C e observadas após 24 e 48 horas. As zonas de inibição (halo branco) indicaram a presença do composto ativo.

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi feita para CI_{50} do teste antimalárico obtendo-se a curva dose resposta através do programa Microcal Origin.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Esta pesquisa foi iniciada motivada principalmente pela busca de extratos de plantas com atividade antimalárica, uma vez que muitas comunidades tradicionais e indígenas utilizaram preparações feitas com plantas para o tratamento desta doença, que ainda atinge um grande número de indivíduos no mundo todo. Ambas as espécies, *G. argenteum* e *M. guianensis*, foram coletadas porque há registros na literatura sobre o seu uso não só no Brasil, mas também em países que fazem parte da Amazônia, para tratamento e prevenção da malária. A coleta destas duas espécies também foi motivada pelo nome popular, “acariquara”, atribuído à ambas, dependendo da região.

Os resultados desta pesquisa, obtidos para a composição química e ensaios biológicos realizados com os extratos e ou frações foram agrupados de acordo com a espécie de planta pesquisada.

4.1 *G. argenteum*

Os extratos obtidos de casca de *G. argenteum* submetidos partição líquido-líquido, resultaram nas frações hexânica, clorofórmica, acetato de etila e metanol/água. Destas a fração clorofórmica foi fracionada em coluna cromatográfica gradiente, resultando 38 frações e destas a fração Cr10 foi submetida a uma cromatografia preparativa (CCD – P) o que resultou em sete (7) frações e destas apenas a F6 foi positiva para alcalóides. Os extratos e frações obtidas por partição líquido-líquido foram testados para a atividade antiplasmódica e antimicrobiana.

O teor extrativo (tabela 9) foi calculado a partir da massa do extrato seco em relação à massa de serragem utilizada na extração e pelos valores obtidos verificou-se que o metanol foi um solvente eficiente no processo de extração.

Tabela 9 - Teor extrativo da extração metanólica e aquosa de *G. argenteum*

Código	Parte da planta	Solvente	Massa de serragem (g)	Massa extrato (g)	Teor extrativo (%)
GAGM	Galhos	Metanol	255,46	33,67	13,18
GAFM	Folhas	Metanol	243,81	65,54	26,88
GACM	Cascas	Metanol	269,55	50,87	18,87
GAGH	Galhos	Água	120,28	6,37	5,30
GAFH	Folhas	Água	60,18	4,96	8,25
GACH	Cascas	Água	112,00	8,45	7,55

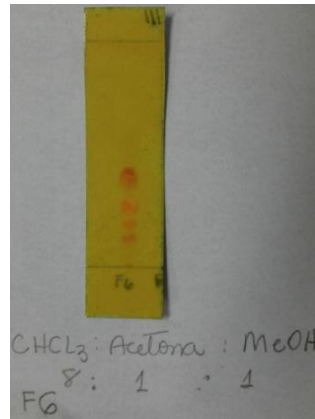
Fonte: Do autor (2011).

4.1.1 Composição química

Os extratos brutos e as frações obtidas por partição líquido-líquido (frações hexânica, clorofórmica, acetato de etila e metanol/água), frações da coluna cromatográfica e da cromatografia preparativa, foram submetidos à análise através de CCDs, as quais foram reveladas com luz ultravioleta 254 nm e 366 nm, vapor de iodo, Dragendorff e *para*-anisaldeído. Tais análises indicaram presença de alcalóides (Dragendorff: positivo). Os fracionamentos realizados tinham por objetivo isolar substâncias, contudo, após a análise da fração F6, positiva para alcalóides, obtida através cromatografia preparativa por CCD verificou-se que não era uma substância pura (figura 35).

Os alcalóides são apontados (JANOT et al., 1958; PUISIEUX et al., 1959) como sendo os principais constituintes deste gênero, o que também foi observado no presente estudo.

Figura 35 - Fração F6, obtida da fração Cr 10, positiva para alcalóides (Dragendorff positivo)

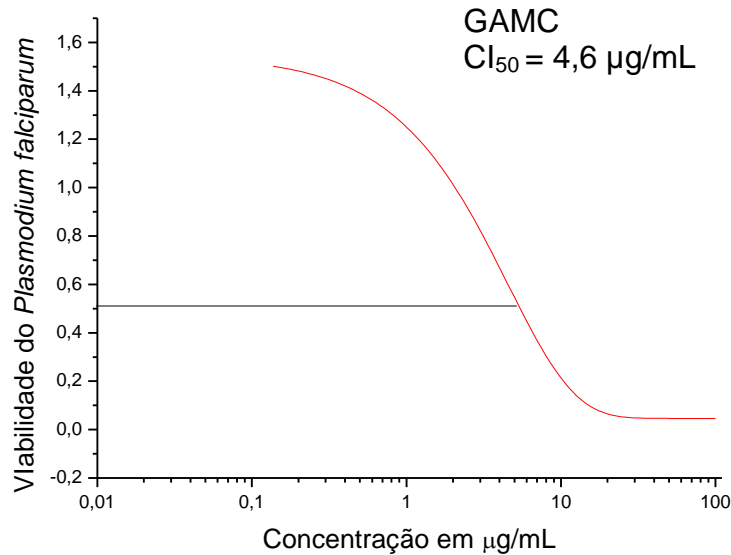


Fonte: Do autor (2011).

4.1.2 Atividade antimalárica de extratos e frações de *G. argenteum*

Os resultados do screening inicial e CI_{50} para atividade antimalárica *in vitro* estão descritos na tabela 10. Os percentuais de inibição para os extratos ativos, metanólicos ou aquosos foram semelhantes (90 a 96%). O extrato metanólico, GAFM, e aquoso, GACH, obtidos de folhas e casca respectivamente apresentaram os maiores percentuais de inibição na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$, mas na concentração de 5 $\mu\text{g/mL}$ o extrato GAFM apresenta melhor atividade. Nenhum dos extratos foi inativo *in vitro* (% inibição < 50%). A análise dos valores da CI_{50} mostrou que o extrato metanólico obtido de casca de *G. argenteum* foi ativo na concentração de 4,6 $\mu\text{g/mL}$, de acordo com critérios propostos por Bertani et al. (2005). A curva-dose resposta feita através do Microcal Origin (figura 36) apresenta a redução da viabilidade da cepa de *P. falciparum* em função do aumento da concentração do extrato testado e também indica a CI_{50} na curva.

Figura 36 - Curva dose-resposta do extrato ativo



Fonte: Do autor (2011).

Também foram testadas frações obtidas de casca por partição líquido-líquido, cujos resultados estão descritos na tabela 10. As frações hexânica (GAPH), acetato de etila (GAPA) e hidroalcoólica (GAPM) foram parcialmente ativas enquanto que a fração clorofórmica (GAPC) foi ativa no screening inicial com 90 % de redução do crescimento do parasita e apresentou uma CI₅₀ de 2,0 µg/mL, portanto, também ativa, de acordo com o critério adotado por Bertani et al. (2005).

Geissospermum spp. são plantas com reputação antimalárica, principalmente na Amazônia, incluindo países como Guiana Francesa, Colômbia e Bolívia (MILLIKEN, 1997; BRANDÃO et al., 1992; STEELE et al., 2002; MUÑOZ et al., 2000; BERTANI et al., 2005; VIGNERON et al., 2005) por isso nos últimos 20 anos vários autores realizaram testes antimaláricos, *in vivo* e *in vitro*, com diferentes extratos com o objetivos de verificar se o seu uso por comunidades, nos diferentes países da norte da América do Sul, seria justificado.

Muñoz et al. (2000) e Steele et al. (2002) também obtiveram resultados positivos de inibição parasitária, ao testar extrato de casca de *G. laeve* e *G. sericeum*, respectivamente. Steele et al. (2002) ainda testou substâncias isoladas, dentre elas a flavopereirina, com IC₅₀ de 1,83 µM, *in vitro*.

Extratos de *G. argenteum* foram testados *in vivo* com inibição parasitária de 44,3% e no ciclo intra-hepático com inibição de 83%, contudo não foi verificado na literatura pesquisada, testes *in vitro*, com extratos, frações e ou substâncias isoladas desta espécie.

Tabela 10 - Atividade antimalárica de extratos e frações de *G. argenteum*

Código do extrato	Parte da planta	Classificação da atividade (Screening inicial)	Redução do crescimento parasitário (%)		Cl ₅₀ µg/mL	Classificação da atividade (Cl ₅₀)
			50 µg/L	5µg/mL		
GAFM	Folha	A	96	79	6,9	AM
GAGM	Galho	A	90	47	6,6	AM
GACM	Casca	PA	78	74	4,6	A
GAFH	Folha	A	93	43	9,0	AM
GACH	Casca	A	96	16	15,4	I
GAGH	Galho	PA	78	43	6,9	I
GAPH	Casca	PA	64,2	5,3	NT	NT
GAPA	Casca	PA	79,0	31,6	NT	NT
GAPC	Casca	A	90,0	78,9	2,0	A
GAPM	Casca	PA	78,0	5,3	NT	NT

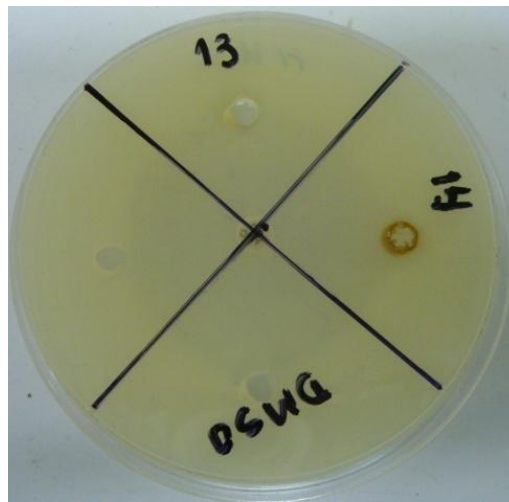
Classificação da atividade do screening inicial: A (ativo) = 80 – 100 %; PA (parcialmente ativo) = 50 – 79 %; I (inativo) = < 50 %. Classificação da atividade de acordo com: Cl₅₀ < 0,1 µg/mL = muito ativo (MA); de 0,1 a 5 µg/mL = ativo (A); de 5 a 10 µg/mL = atividade moderada (AM); Cl₅₀ > 11 µg/mL = inativo (I).

Fonte: Do autor (2011).

4.1.3 Atividade antibacteriana e antifúngica

Na atividade antimicrobiana realizada através de difusão em ágar (tabela 11) verificou-se que os extratos aquosos GAGH (galhos) e GACH (casca), e os metanólicos, GAFM (folhas) e GAGM (galhos) foram inativos para *S. aureus* (figura 37).

Figura 37 - Extratos inativos (13 e 14) e controle negativo (DMSO) sem halo de inibição frente a *S.aureus*



Fonte: Do autor (2011).

Os extratos e frações que apresentaram inibição de crescimento para esta cepa bacteriana foram: GAFH (aquoso obtido de folhas) com halo de inibição de 10 mm, GACM (metanólico de casca) com halo de 9 mm, GAPA (fração acetato de etila da casca) com halo de 11 mm e GAPM (fração metanólica da casca) com halo de 10 mm, mas todos foram parcialmente ativos. Para *S. aureus* os extratos apresentaram menor inibição que o controle (cloranfenicol) cujo halo de inibição foi de 22 mm. Contra *S. mutans* o extrato metanólico de casca e a fração hexânica apresentaram-se parcialmente ativos. A cepa bacteriana de *E. coli* e a fúngica de *C. albicans* mostraram-se resistentes aos extratos testados.

Tabela 11 - Halos de inibição microbiana

Código do extrato	Bactérias			Levedura
	<i>S. aureus</i>	<i>S. mutans</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>
GAFH	10 mm (PA)	I	I	I
GAGH	I	I	I	I
GACH	I	I	I	8 mm (I)
GAFM	I	I	I	I
GAGM	I	I	I	8 mm (I)
GACM	9 mm (PA)	12 mm (PA)	I	I
GAPH	I	10 mm (PA)	I	I
GAPA	11 mm (PA)	I	I	I
GAPM	10 mm (PA)	I	I	I
Cloranfenicol	22 mm (MA)	25 mm (MA)	22 mm (MA)	NT
Itraconazol	NT	NT	NT	23 (MA)
DMSO	I	I	I	I

I (inativo): < 9 mm; PA (parcialmente ativo): 9 -12 mm; A (ativo): 13 – 18 mm; MA (muito ativo): > 18 mm. Cloranfenicol e itraconazol: controles positivos para bactérias e levedura respectivamente. DMSO: controle negativo.

Fonte: Do autor (2011).

Correia et al. (2008) também realizaram avaliação da atividade antimicrobiana de extratos etanólicos brutos de *G. argenteum*, frente a cepas ATCC e multi-drogas resistentes de *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Streptococcus pneumoniae*, obtendo inibição de cepas ATCC de *S. aureus* (CIM = 80,0 µg/mL) e *Pseudomonas aeruginosa*, (CIM = 20,0 µg/mL), além de inibição da cepa de *S. aureus* multi-drogas resistente (CIM = 5,0 µg/mL).

Nos testes de microdiluição com amostras de *G. argenteum* a CIM (tabela 7) para *E. coli* foi acima de 1 mg/mL, o que indica que esta cepa foi resistente aos extratos testados. Para *S. aureus* a melhor atividade foi do extrato metanólico de casca com CIM de 0,63 mg/ mL, enquanto que para *S. mutans* a melhor atividade foi do extrato metanólico de galhos e para a levedura *C. albicans* o extrato de folhas apresentou a CIM de 0,63 mg/mL.

Tabela 12 - CIM através do método da microdiluição

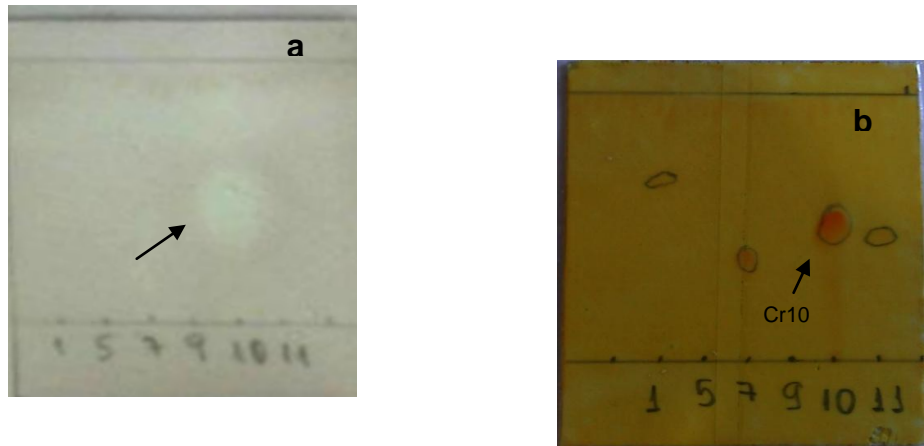
Código do extrato	Bactérias			Levedura
	<i>S. aureus</i>	<i>S. mutans</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>
GAFH	>1 mg/mL	>1 mg/mL	I	>1 mg/mL
GAGH	>1 mg/mL	>1 mg/mL	I	>1 mg/mL
GACH	>1 mg/ mL	>1 mg/mL	>1 mg/mL	>1 mg/mL
GAFM	>1 mg/mL	>1 mg/mL	I	0,63 mg/ mL
GAGM	>1 mg/mL	0,63 mg/ mL	I	>1 mg/mL
GACM	0,63 mg/ mL	>1 mg/mL	>1 mg/mL	>1 mg/mL
GAPH	>1 mg/mL	>1 mg/mL	I	>1 mg/mL
Cloranfenicol	0,39 µg/mL	0,19 µg/mL	0,39 µg/mL	NT
Itraconazol	NT	NT	NT	0,39 µg/ mL
DMSO	I	I	I	I

I – inativo; NT – não testado; . >1 mg/mL = inativo; 0,63 mg/ mL = ativo.

Fonte: Do autor (2011).

A fração Cr10, obtida através de cromatografia em coluna foi testada frente a *S. aureus*, utilizando a técnica da bioautografia e apresentou zona de inibição para esta bactéria gram positiva. A bioautografia foi comparada à cromatoplaça de referência e nesta a fração Cr 10, positiva para alcalóides corresponde à zona de inibição observada na bioautografia (figura 38).

Figura 38 - Bioautografia para *S. aureus* mostrando zona de inibição de crescimento bacteriano (a); cromatoplaça de referência indicando a fração Cr 10 positiva para alcalóides (b)



Fonte: Do autor (2011).

4.2 *Minquartia guianensis*

Para a espécie *M. guianensis* foi realizada a preparação de extratos de cascas, folhas e galhos e avaliação da atividade antimalárica, antibacteriana e antifúngica somente destes extratos, uma vez que não foi feito fracionamento e análise química dos mesmos.

Os extratos foram produzidos a partir de extração metanólica a quente e infusão e o teor extrativo (tabela 13) foi calculado através da massa do extrato seco em relação à massa da serragem utilizada na extração.

Tabela 13 - Teor extrativo da extração metanólica e aquosa de *M. guianensis*

Código do extrato	Parte da planta	Solvente	Massa de Serragem (g)	Massa do extrato (g)	Teor extrativo (%)
MGGM	Galhos	Metanol	92,08	8,42	9,1
MGFM	Folhas	Metanol	180,99	28,60	15,8
MGCM	Cascas	Metanol	458,8	69,00	15,0
MGFH	Folhas	Água	83,06	9,25	11,1
MGGH	Galhos	Água	27,05	1,92	7,1
MGCH	Cascas	Água	150,00	9,7	6,5

Fonte: Do autor (2011).

4.2.1 Atividade antimalárica de extratos *M. guianensis*

Foram testados os extratos metanólicos e aquosos obtidos de cascas, folhas e galhos contra *P. falciparum*, cepa K1, dissolvidos em DMSO, em duas concentrações, 5 e 50 µg/mL, cujos resultados do screening inicial e CI_{50} estão expressos na tabela 14. Os extratos MGFM (extração metanólica) e MGCH (extração aquosa) foram ativos, sendo que o extrato MGFM também se apresentou parcialmente ativo (79%) na concentração de 5%. Os demais extratos foram inativos. No entanto a análise da CI_{50} indicou a inatividade dos extratos, pois a inibição só ocorreu em altas concentrações.

Tabela 14 - Atividade antimalárica de extratos *M. guianensis*

Código do extrato	Parte da planta	Classificação da atividade	Redução do crescimento parasitário (%)		CI ₅₀ µg/mL	Classificação da atividade
			50 µg/mL	5µg/mL		
MGFM	Folha	A	96	79	12,0	I
MGGM	Galho	PA	76	0	> 50,0	I
MGCM	Casca	PA	65	0	> 50,0	I
MGFH	Folha	PA	65	0	> 50,0	I
MGGH	Galho	PA	76	0	> 50,0	I
MGCH	Casca	A	93	44	20,0	I

Classificação da atividade do screening inicial: A (ativo) = 80 – 100 %; PA (parcialmente ativo) = 50 – 79 %; I (inativo) = < 50 %. Classificação da atividade de acordo com: CI₅₀ < 0,1 µg/mL = muito ativo (MA); de 0,1 a 5 µg/mL = ativo (A); de 5 a 10 µg/mL = atividade moderada (AM); CI₅₀ > 11 µg/mL = inativo (I). NT: não testada.

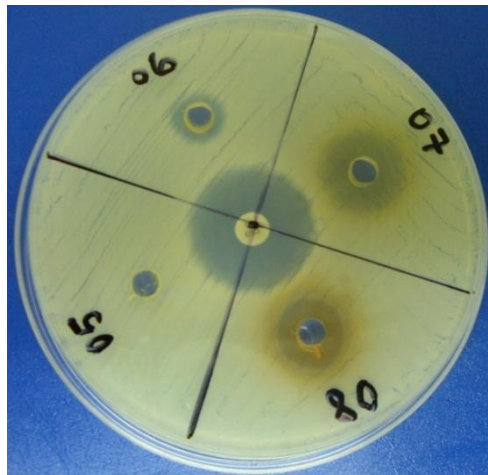
Fonte: Do autor (2011).

Na literatura pesquisada não foram encontrados relatos de estudos da atividade antimalárica de extratos de *M. guianensis* feitos no Brasil e poucos trabalhos foram encontrados para a atividade antiplasmódica desta espécie em outras localidades. Rasmussen et al. (2000) depois de realizar levantamento etnobotânico no Peru testou, *in vitro*, extratos de *M. guianensis*, obtendo IC₅₀ de 3,0 µg/mL. Dados semelhantes foram obtidos por Ruiz et al. (2011) em testes *in vitro* (IC₅₀ = 4,2 µg/mL). Gachet et al. (2010) realizou no Equador um levantamento etnobotânico e neste *M. guianensis* foi citada entre as plantas utilizadas para o tratamento da malária, o que é coerente com os resultados obtidos.

4.2.2 Atividade antibacteriana e antifúngica

Dos extratos testados através de difusão em ágar (tabela 15) apenas o extrato MGFM (metanólico), obtido de folhas foi totalmente inativo frente a *S. aureus*, Os demais apresentaram atividade, com halos de inibição que variaram de 10 a 14 mm (figura 39). Nas referências pesquisadas não foram encontrados relatos de testes antibacterianos ou antifúngicos para esta planta. Nas pesquisas etnofarmacológicas realizadas para esta espécie ela é indicada principalmente como anti-helmíntica e anti-protozoária (RASMUSSEN, 2000).

Figura 39 - Ação de extratos de *M. guianensis* em cepa de *S. aureus*



Fonte: Do autor (2011).

Tabela 15 - Atividade antimicrobiana através de difusão em ágar

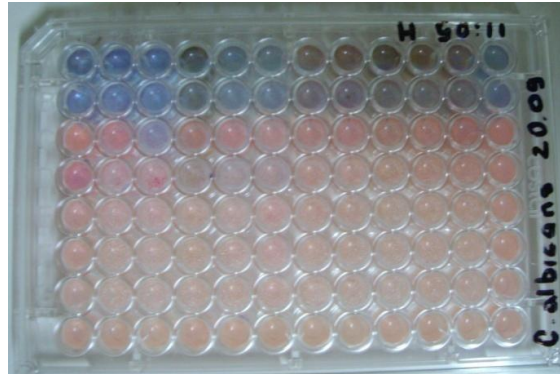
Código do extrato	Bactérias			Levedura
	<i>S. aureus</i>	<i>S. mutans</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>
MGFH	14 mm (A)	I	I	I
MGCH	14 mm (A)	I	8 mm (I)	12 mm (PA)
MGFM	Inativo	I	I	I
MGGM	11 mm (PA)	I	I	14 mm (A)
MGCM	10 mm (PA)	I	I	I
Cloranfenicol	22 mm (A)	25 mm (A)	22 mm (A)	NT
Itraconazol	NT	NT	NT	23 (A)
DMSO	Inativo	I	I	I

I (inativo): < 9 mm; PA (parcialmente ativo): 9 -12 mm; A (ativo): 13 – 18 mm; MA (muito ativo): > 18 mm.

Fonte: Do autor (2011).

Na avaliação da concentração inibitória mínima (figura 40) através do método de microdiluição em placa os extratos de *M. guianensis* foram inativos frente à cepa de *E. coli*, uma bactéria gram negativa e também para os demais micro-organismos testados.

Figura 40 - CIM através de microdiluição para *C. albicans* (cor azul indica inibição celular e cor rosa indica proliferação celular)



Fonte: Do autor (2011).

Tabela 16 - CIM através do método da microdiluição

Código do extrato	Bactérias			Levedura
	<i>S. aureus</i>	<i>S. mutans</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>
MGFH	I	>1 mg/ mL	I	>1 mg/ mL
MGCH	I	>1 mg/ mL	I	>1 mg/ mL
MGFM	>1 mg/ mL	>1 mg/ mL	I	>1 mg/ mL
MGGM	>1 mg/ mL	>1 mg/ mL	I	>1 mg/ mL
MGCM	>1 mg/ mL	>1 mg/ mL	I	>1 mg/ mL
Cloranfenicol	0,39 µg/ mL	0,19 µg/ mL	0,39 µg/ mL	NT
Itraconazol	NT	NT	NT	0,39 µg/ mL
DMSO	I	I	I	I

I: inativo; NT: não Testado

Fonte: Do autor (2011).

Todos os extratos apresentaram atividade de inibição de crescimento para a bactéria gram positiva *S. mutans* e para a levedura *C. albicans*, porém numa concentração inibitória considerada elevada para extratos, cujo valor ideal é abaixo de 1,0 mg/mL.

5 CONCLUSÃO

Através deste trabalho foi possível verificar que a espécie *G. argenteum* possui em sua composição química predominantemente substâncias do grupo dos alcalóides.

O extrato metanólico obtido de cascas de *G. argenteum* foi ativo para a atividade antiplasmódica, por apresentar uma CI_{50} de 4,6 $\mu\text{g/mL}$ *in vitro*, frente a cepa K1 de *P. falciparum*.

A fração clorofórmica obtida de casca de *G. argenteum* foi ativa, *in vitro*, para atividade antimalárica com CI_{50} de 2,0 $\mu\text{g/mL}$.

Extratos de *M. guianensis* foram considerados inativos frente a *P. falciparum* após a determinação da CI_{50} .

Quanto à atividade antimicrobiana de *G. argenteum*, os extratos GAFH, GACM e as frações GAPA e GAPM foram parcialmente ativos para *S. aureus*. O extrato GACM e a fração GAPH foram parcialmente ativos frente a *S. mutans*. A CIM através da microdiluição foi de 0,63 mg/mL do extrato GACM para *S. aureus*, 0,63 mg/mL do extrato GAGM para *S. mutans* e 0,63 mg/mL do extrato GAFM para *C. albicans*. As amostras testadas de *G. argenteum* foram inativas contra *E. coli* e *C. albicans* através do método de difusão em ágar.

A fração Cr10 obtida por cromatografia em coluna foi ativa frente a *S. aureus* através da bioautografia.

Os extratos MGFH e MGCH de *M. guianensis* mostraram-se ativos frente à *S. aureus* e o MGGM foi ativo frente à *C. albicans* através de difusão em ágar. Através do método de microdiluição e apresentaram CIM superior a 1mg/ml para *S. aureus*, *S. mutans* e *C. albicans*. Os extratos de *M. guianensis* foram inativos contra *E. coli*.

Uma vez que extratos e frações de *G. argenteum* foram ativas frente à cepa de *P. falciparum* torna-se importante a continuidade deste trabalho com isolamento de substâncias e novos testes antimaláricos.

REFERÊNCIAS

ABRAXAS BIO LABS SA. Beljanski, M. **Composition pharmaceutique a base de flavopereirine et son utilization dans un traitement contre le virus VIH.** A61K31/475, 26 jul. 1993, 3 fev 1994.

ALMEIDA, M. R. et al. Pereirina: o primeiro alcalóide isolado no Brasil? **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 4, p. 942-952, out./dez., 2009.

ANDRADE-NETO, V. F. et al. Antimalarial activity of phenazines from lapachol, β -lapachone and its derivatives against *Plasmodium falciparum in vitro* and *Plasmodium berghei in vivo*. **Bioorg. Med. Chem. Letters**, v. 14, p. 1145-1149, 2004.

ANDRADE-NETO, V. F.; et al. *In vitro* inhibition of *Plasmodium falciparum* by substances isolated from Amazonian antimalarial plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 3, p. 359-365, jun. 2007.

BAN, Y.; SEO, M. The synthesis of B-carboline derivatives –I. A synthesis of some 12H-indolo[2,3-a]pyridocolinum salts, including flavopereirine. **Tetrahedron**, v. 16, p. 5-10, 1961.

BAUER, A. W. et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. **American Journal Clinical Pathology**, n. 45, n. 4, p. 493-496, abr., 1966.

BEJAR, O. et al. Constitution de la flavopereirine, alcaloide du *Geissospermum leave* (Vellozo) Baillon (Apocynacées). **Académie des Sciences**, p. 2066-2068, abr., 1957

BERTANI, S. et al. Evaluation of French Guiana traditional antimalarial remedies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 98, p. 45-54, abr., 2005.

BERTHO, A.; KOLL, M. Alkaloide der Pereiro-Rinde, VI. Die constitution von Pereirin. **Chemische Berichte**, v. 94, p. 2737-2746, 1961.

BOURDY, G. et al. Ethnopharmacology and malaria: new hypothetical leads or old efficient antimalarials? **International Journal for Parasitology**, v. 38, p. 33-41, jan., 2008.

BRANDÃO, M. G. L. et al. Brazilian medicinal plants described by 19th century European naturalists and Official Pharmacopeia. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, p.141-148, nov., 2008.

BRANDÃO, M. G. L. et al. Survey of medicinal plants used as antimalarials in the Amazon. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 36, p. 175-182, abr., 1992.

BRASIL. Ministério da Saúde – MS. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação Geral do Programa Nacional de Controle da Malária. **Malária no Brasil**. Brasília: Ministério da Saúde, 2009. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/situacao_da_malaria_site_svs_28_12.pdf. Acesso em: 21 abr. 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde – MS. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RDC n. 48**, 16 mar. 2004. Dispõe sobre registro de medicamentos fitoterápicos. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/rdc_48_16_03_04_registro_fitoterapicos%20.pdf. Acesso em: 21 maio. 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Dados epidemiológicos de malária, por estado. Amazônia Legal, janeiro a maio de 2009 e 2010**. Brasília: SIVEP, 2010. Disponível em: <http://dw.saude.gov.br/malaria>. Acesso em: 15 jul. 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância em Saúde. **Guia prático de tratamento da malária no Brasil**. Brasília: Ministério da Saúde, 2010.

BRITO, A. R. M.; BRITO, A. A. Forty years of Brazilian medicinal plant research. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 39, p. 53-67, maio, 1993.

CAMARGO, J. L. C.; FERRAZ, I. D. K. Acariquara roxa, *Minquartia guianensis* Aubl. **Informativo Técnico Rede de Sementes da Amazônia**, n. 10, 2005. Mês N/C

CARNEIRO, A. L. B. et al. Screening of Amazonian plants from the Adolpho Ducke Forest reserve, Manaus, state of Amazonas, Brazil, for antimicrobial activity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 1, p. 31-38, fev. 2008.

CARVALHO, C. M. O lavrado da serra da Lua em Roraima e perspectivas para estudos da herpetofauna da região. **Revista Geográfica Acadêmica**, v. 3, n. 1, p. 4-17, jun., 2009.

CHIARONI, A. et al. Alcaloides indoliques CIV: Structure cristalline de la geissospermine. **Tetrahedron Letters**, n. 51, p. 4729-4730, 1976.

CHIARONI, A.; RICHE, C. Structure et stéréochimie d'alcaloides indoliques. Structure de la geissospermine. **Structural Crystallography and Crystal Chemistry**, v. B35, p. 1820-1825, ago., 1979.

COLLINS, C. H.; Princípios básicos de cromatografia. In: COLLINS, C. H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P. S. (Org.). **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas, SP: Editora da Unicamp, 2006, p. 17-42.

CORREIA, A. F. et al. Amazonian plant crude extract screening for activity against multidrug-resistant bacteria. **European Review for Medical and Pharmacology Sciences**, v.12, n.6, p.369-380, nov./dez., 2008.

CURSINO, L.M.C. et al. Triterpenos de folhas de *Mimosa guianensis* Aubl. (Olacaceae). **Acta Amazônica**, v. 39, n. 1, p. 181 – 186, 2009.

DEHARO, E. et al. **Técnicas de laboratório para la selección de sustancias antimaláricas**. 1. ed. La Paz, Bolivia: Imprenta Perez, 2000, 187 p.

DI STASI, L. C. (ORG.). **Plantas medicinais: arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar**. São Paulo: Editora UNESP, 1996.

FALKENBERG, M. B.; SANTOS, R. I.; SIMÕES, C. M. O. Introdução à análise fitoquímica. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2004, p. 229-245.

FORZZA, R. C. (Org.). **Catálogo de Plantas e Fungos do Brasil**. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio: Instituto de Pesquisa do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010. 875 p. v. 1.

GACHET, M. S. et al. Assessment of anti-protozoal activity of plants traditionally used in Ecuador in the treatment of leishmaniasis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 128, n. 1, p. 184-197, 2010.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2004, p. 13-28.

GOUTAREL, R. et al. ^{13}C Analysis of geissospermine and its indole alkaloid monomer fragments. **Tetrahedron Letters**, v. 14, p. 1235-1238, 1978.

JÁCOME, R. L. R. P.; SOUZA, R. A.; OLIVEIRA, A. B. Comparação cromatográfica entre o extrato de *Aspidosperma parvifolium* e o fitoterápico "Pau-Pereira". **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, p. 39-41, jan./jun., 2003.

KOROLKOVAS, A.; BURCKHALTER, J. H. **Química Farmacêutica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988.

LAMBROS, C.; VANDERBERG, J. P. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocyte stages in cultura. **Journal of Parasitology**, v. 65, p. 418-420, 1979.

LIMA, J. A. et al. *Geissospermum vellosii* stem bark: anticholinesterase activity and improvement of scopolamine-induced memory deficits. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 92, p. 508-513, maio, 2009.

LOPES, J. L. C. Cromatografia em camada delgada. In: COLLINS, C. H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P. S. (Org.). **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas, SP: Editora da Unicamp, 2006, p. 67-85.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. 2. ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2002. v. 2.

MARIATH, I. R. et al. Plants of the American continent with antimalarial activity. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 1A, p. 158-192, jan./mar., 2009.

MARLES, R. J.; FARNSWORTH, N. R.; NEILL, D. A. Isolation of a novel cytotoxic polyacetilene from a traditional anthelmintic medicinal plant, *Minquartia guianensis*. **Journal of Natural Products**. v. 52, n. 2, p. 261-266, 1989.

MILLIKEN, W. Traditional antimalarial medicine in Roraima, Brazil. **Economic Botany**, v. 51, p. 212-237, 1997.

MOORE, R. E.; RAPOPORT, H. Geissosvelline, a new alkaloid from *Geissospermum vellosii*. **Journal of the Organic Chemistry**, v. 38, n. 2, p. 215-230, 1973.

MUÑOZ, V. et al. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. Part I. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by Chacobo Indians. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 69, n. 2, p.127-137, fev., 2000.

NATURAL SOURCE INTERNATIONAL. J. L. Hall, S. P. Beljanski. **Flavopereirine and alstonine combinations in the treatment and prevention of prostate cancer**. WO2005112964 (A1), 19 maio 2004, 01 dez. 2005.

NEVES, D. P. et al. **Parasitologia humana**. 11. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2010, p. 143-161.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M. K. **Farmacognosia**. São Paulo: Atheneu, 1998.

PACCIONI, J. P.; HUSSON, H. P. Alkaloids of *Geissospermum argenteum* (Apocynaceae). **Phytochemistry**, v. 17, n. 12, p. 2146-2147, 1978.

PUISIUEX, F. et al. Alkaloids of *Geissospermum laeve*. III. Geissoschizoline, apogeissoschizine and geissospermine. **Annales Pharmaceutiques Françaises**, v. 17, p. 626-633, 1959.

RAPOPORT, H. et. al. Alkaloids of *Geissospermum vellosii*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 80, p. 1601-1604, 1958.

RAPOPORT, H. et al. Alkaloids of *Geissospermum vellosii*. Futher Studies on Geissospermine and the Structures of the Indolic Cleavage Products, Geissoschizine and Apogeissoschizine. **Journal of the American Chemical Society**, v. 82, p. 4404-4414, 1960.

RAPOPORT, H.; MOORE, R. E. Alkaloids of *Geissospermum vellosii*. Isolation and structure determinations of vellosimine, vellosiminol and geissolosimine. **Journal of the Organic Chemistry**, v. 27, p. 2981-2985, 1962.

RASMUSSEN, H. B. et al. Absolute configuration and antiprotozoal activity of minquartynoic acid. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1295-1296, 2000.

REIS, M. S.; MARIOT, A.; STEENBOCK, W. Diversidade e domesticação de plantas medicinais. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2004, p. 45-74.

REY, L. **Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008, p. 207-205.

RIBEIRO, J. E. L. S. et al. **Flora da Reserva Ducke: guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra firme na Amazônia Central**. Manaus: INPA, DIFID, 798 p., 1999.

ROSA-FREITAS, M. G. et al. Ecorregiões de Roraima: a importância da paisagem na epidemiologia da malária. In: BARBOSA, R. I.; MELO, V. F. (Org.). **Roraima: homem, ambiente e ecologia**. Boa Vista: FEMACT, 2010, p. 431-449.

RUIZ, L. et al. Plants used by native Amazonian groups from Nanay river (Peru) for the treatment of malaria. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, p. 917-921, 2011.

SANTOS, N. P.; PINTO, A. C.; ALENCASTRO, R. B. Theodoro Peckolt: naturalista e farmacêutico do Brasil imperial. **Química Nova**, v. 21, p. 666-670, 1998.

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2004, p. 403-434.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para a identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APGII**. Nova Odessa-SP: Instituto Plantarum, 2005.

STEELE, J. C. P. et al. Indole and β -carboline alkaloids from *Geissospermum sericeum*. **Journal of Natural Products**, v. 65, p. 85-88, jan., 2002.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Rio de Janeiro: Ed. Artmed. 2004, 720 p.

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

VIGNERON, M.; DEPARIS, X.; DEHARO, E.; BOURDY, G. Antimalarial remedies in French Guiana: a knowledge attitudes and practices study. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 98, p. 351-360, abr., 2005.

WENKERT, E.; KILZER, J. A flavopereirine synthesis. **Journal of Organic Chemistry**, v. 27, p. 2283-2284, 1962.

WERNER, J. A. T. et al. Evidence for a role of 5-HT_{1A} receptor on antinociceptive action from *Geissospermum vellosii*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 125, p. 163-169, ago. 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Who Global Malaria Programme. **World Malaria Report**, Geneva, 2010. 238 p.

ANEXOS

ANEXO A – LAYOUT DA PLACA PARA TESTE *IN VITRO* UTILIZADO NO LABORATÓRIO DA GERÊNCIA A FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL – MANAUS – AM

Layout de placa para teste in vitro

Placa: _____

Data: ___/___/___ Hora: _____ Responsável: _____

Período de incubação: _____ Cepa: _____

Código	Nº Poço	Posição na Placa	Concentração inicial	Fator

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

Obs.: _____

ANEXO B: ESQUEMA PARA LEITURA DE LÂMINAS EM TESTE ANTIMALÁRICO
IN VITRO

Cont.:				
Nº Lam.:		Nº Esf.:		
Nº C	H	An	Tf.	Eq
01				
02				
03				
04				
05				
06				
07				
08				
09				
10				
11				
12				
13				
Tot.				
Parasitemia:				
Obs.:		Poço:		

Cont.:				
Nº Lam.:		Nº Esf.:		
Nº C	H	An	Tf.	Eq
01				
02				
03				
04				
05				
06				
07				
08				
09				
10				
11				
12				
13				
Tot.				
Parasitemia:				
Obs.:		Poço:		

Cont.:				
Nº Lam.:		Nº Esf.:		
Nº C	H	An	Tf.	Eq
01				
02				
03				
04				
05				
06				
07				
08				
09				
10				
11				
12				
13				
Tot.				
Parasitemia:				
Obs.:		Poço:		

Cont.:				
Nº Lam.:		Nº Esf.:		
Nº C	H	An	Tf.	Eq
01				
02				
03				
04				
05				
06				
07				
08				
09				
10				
11				
12				
13				
Tot.				
Parasitemia:				
Obs.:		Poço:		

