



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA - UNIR
NÚCLEO DE SAÚDE – DEPARTAMENTO DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EXPERIMENTAL

DIONATAS ULISES DE OLIVEIRA MENEGUETTI

**ANÁLISE GENOTÓXICA E ANTIPARASITÁRIA DE EXTRATOS E
SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE *Maytenus guianensis* KLOTZSCH EX REISSEK
(CELASTRACEAE), CHICHUÁ (XIXUÁ) AMAZÔNICO**

PORTO VELHO

2015

DIONATAS ULISES DE OLIVEIRA MENEGUETTI

**ANÁLISE GENOTÓXICA E ANTIPARASITÁRIA DE EXTRATOS E
SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE *Maytenus guianensis* KLOTZSCH EX REISSEK
(CELASTRACEAE), CHICHUÁ (XIXUÁ) AMAZÔNICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Experimental da Universidade Federal de Rondônia, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Biologia Experimental.

Orientador: Prof. Dr. Valdir Alves Facundo.

PORTO VELHO

2015

FICHA CATALOGRÁFICA
BIBLIOTECA PROF. ROBERTO DUARTE PIRES

N.541a

Meneguetti, Dionatas Ulises de Oliveira.

Análise genotóxica e antiparasitária de extratos e substâncias isoladas de *Maytenus guianensis* Klotzsch Ex Reissek (Celastraceae), chichuá (xixuá) amazônico. Dionatas Ulises de oliveira Meneguetti, Porto Velho, Rondônia, 2015.

183f.; il.

Orientador: Prof. Dr. Valdir Alves Facundo.

Tese (Doutorado em Biologia Experimental). Fundação Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, 2015.

1. *Maytenus guianensis*. 2. Genotoxicidade. 3. *Plasmodium falciparum*. 4. *Leishmania amazonensis*. I. Fundação Universidade Federal de Rondônia. II. Título.

CDU: 616.936

Bibliotecária Responsável: Luã Silva Mendonça- CRB11/905

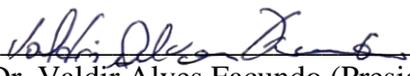
DIONATAS ULISES DE OLIVEIRA MENEGUETTI

**ANÁLISE GENOTÓXICA E ANTIPARASITÁRIA DE EXTRATOS E
SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE *Maytenus guianensis* KLOTZSCH EX REISSEK
(CELASTRACEAE), CHICHUÁ (XIXUÁ) AMAZÔNICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Experimental da Universidade Federal de Rondônia, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Biologia Experimental, banca examinadora:

Data da aprovação: 01 de Julho de 2015.

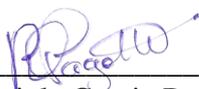
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Valdir Alves Facundo (Presidente)

Prof. Dr. Júlio Sancho Linhares Teixeira Militão (Membro)

Profa. Dra. Carolina Bioni Garcia Teles (Membro)



Prof. Dra. Rubiani de Cassia Pagotto (Membro)

Profa. Dra. Maria Manuela da Fonseca Moura (Membro)

PORTO VELHO

2015

DEDICATÓRIA

À minha filha Sophia Pereira Meneguetti.

Que veio florir a minha vida e foi a minha inspiração nessa reta final do doutorado, que esse trabalho sirva de espelho e que ela se torne uma menina estudiosa e dedicada.

À minha companheira Naila Fernanda Sbsczk Pereira Meneguetti.

Que sempre entendeu a minha ausência, me dando as condições necessárias para eu estar desenvolvendo as atividades referentes à tese. Pessoa que eu tenho admiração e respeito e que também foi uma grande inspiração, sendo uma das maiores incentivadoras nessa caminhada que iniciou ainda na graduação quando nos conhecemos. Espero a partir de agora poder me dedicar ainda mais a criação da nossa filha.

Aos meus pais Luiz André Meneguetti e Marisete Oliveira dos Santos Meneguetti

Pelo eterno incentivo e por todas as condições que sempre me deram para eu estudar, lembro-me das palavras de meu pai, “Filho não temos muito dinheiro, mais uma herança eu vou te dar, uma boa educação e condição para você estudar, e essa herança ninguém vai poder tirar de você”, e realmente o senhor cumpriu a sua promessa e serei eternamente grato ao senhor e a mãe.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida e presença constante, ao meu guia espiritual Mestre Gabriel que sempre está ao meu lado me guarnecendo e dando forças para que eu não desista dos meus sonhos e objetivos, sou grato também por tudo que tens transformado em minha vida.

Ao meu orientador prof. Dr. Valdir Alves Facundo que me direcionou neste trabalho com seu conhecimento e comprometimento na pesquisa. Sempre me tratou com respeito, me dando autonomia em várias decisões sobre a minha tese, e eu vejo a importância dessa confiança para o meu desenvolvimento científico e amadurecimento como pesquisador. Não há como deixar de ressaltar a minha admiração pelo seu profissional e a sua contribuição à Universidade Federal de Rondônia – UNIR como docente e pesquisador, sem dúvida alguma é uma das maiores referências brasileiras na área de Química de Produtos Naturais da Amazônia. E em nome do mesmo agradeço toda a equipe do Laboratório de Química de Produtos Naturais – UNIR, em especial aos colegas Msc. Renato Abreu Lima e Guilherme Matos Passarini.

As professoras Dra. Patrícia Soares Maria de Medeiros e Dra. Carolina Bioni Garcia Teles, pela colaboração na realização dos testes antiplasmodial. E em nome das mesmas agradeço toda a equipe do Laboratório de Quimioterapia de Malária (LQM) – FIOCRUZ/RO, em especial aos colegas Flávio Augusto de Souza Oliveira e Elci Marlei Freitag.

Ao Prof. Dr. Roberto Nicolete, pela colaboração na realização dos testes antileishmanial. E em nome do mesmo agradeço toda a equipe do Laboratório de Biotecnologia Aplicada a Saúde - FIOCRUZ/RO, em especial as colegas Msc. Sharon Rose Aragão e Msc. Neuza Biguinati de Barros.

Aos professores Msc. Francisco Carlos da Silva e Dra. Rubiani de Cassia Pagotto, pela colaboração nos estudos genotóxicos.

Ao prof. Dr. Olzeno Trevisan, meu orientador da graduação, pessoa que tenho um grande reconhecimento e admiração, pois me iniciou na pesquisa científica e despertou em mim a vontade de ser um pesquisador, por meio de suas orientações e conselhos valorosos que sempre terei comigo.

Ao prof. Dr. Luiz Marcelo Aranha Camargo, que também teve uma importância muito grande nessa minha caminhada, me recebeu de braços abertos no ICB-5-USP onde eu considero que tive um amadurecimento e profissionalização científica. Pessoa que está sempre aberta à realização de novas pesquisas e que tem a minha admiração e reconhecimento.

Aos professores do PPGBioExp que por meio de seus conhecimentos e experiência puderam proporcionar mais conhecimentos a nós alunos do programa. Em especial ao Prof. Dr. Alexandre de Almeida e Silva, que sempre esteve à disposição para auxiliar nas questões referentes ao programa.

Aos colegas do programa que também de forma indireta trouxe alguns conhecimentos tanto nas aulas quanto nas conversas informais.

As instituições UNIR, FIOCRUZ, UFAC, INPA, UFES, CEULJI/ULBRA, ICB-5-USP, FAEMA e FIMCA, que de uma maneira direta ou indireta colaboração com o desenvolvimento da tese.

As agências de fomento CAPES e CNPQ.

"Com a constância nos deveres e a prática fiel do bem
estaremos livres de qualquer perigo"

Mestre Gabriel

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Distribuição mundial da família Celastraceae.....	14
Figura 2.	Distribuição das espécies do gênero <i>Maytenus</i> ocorrentes na região Norte.....	17
Figura 3.	Metabólitos secundários isolados de <i>M. obtusifolia</i>	18
Figura 4.	Metabólitos secundários isolados de <i>M. floribunda</i>	19
Figura 5.	Metabólitos secundários isolados de <i>M. ebenifolia</i>	19
Figura 6.	Metabólitos secundários isolados de <i>M. gonoclada</i>	20
Figura 7.	Metabólitos secundários isolados de <i>M. myrsinoides</i>	20
Figura 8.	Metabólitos secundários isolados de <i>M. laevis</i>	21
Figura 9.	Metabólitos secundários isolados de <i>M. guianensis</i>	22
Figura 10.	Espécie <i>M. guianensis</i>	23
Figura 11.	Estrutura química de compostos secundários isolados de plantas da Amazônia com atividade anti- <i>P. Falciparum</i>	37
Figura 12.	Medição das raízes de <i>A. cepa</i>	51
Figura 13.	A – Células de <i>A. cepa</i>	52
Figura 14.	Média do tamanho da germinação dos meristemas de <i>A. cepa</i>	57
Figura 15.	Células de <i>A. cepa</i> em mitose, aumento de 400X.....	58
Figura 16.	Média do número de micronúcleos encontrados em 1000 células de <i>A. cepa</i> , germinadas em extrato aquoso de <i>M. guianensis</i>	59
Figura 17.	Efeito genotóxico e antigenotóxico agudo avaliado em índice de danos e frequência de danos pelo teste cometa em sangue periférico de camundongos, submetidos a tratamento com extrato aquoso de <i>M. guianensis</i>	61
Figura 18.	Efeito mutagênico avaliado pela média do número de micronúcleos em células da medula óssea de camundongos, submetidos a tratamento com extrato aquoso de <i>M. guianensis</i>	64
Figura 19.	Metabólitos secundários isolados do EHC de <i>M. guianensis</i>	72
Figura 20.	Ação antileishmanial de eluatos de <i>M. guianensis</i>	84
Figura 21.	Ação antileishmanial de metabólitos secundários isolados de <i>M. guianensis</i> ...	85
Figura 22.	Atividade anti- <i>P. falciparum</i> (cepa W2) de eluatos e Tingena B isolado de <i>M. guianensis</i>	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Algumas espécies do gênero <i>Maytenus</i> ocorrentes no Brasil, utilizadas na medicina tradicional.....	16
Tabela 2.	Atividade Anti- <i>P. falciparum</i> (cepa 3D7) de extratos e frações de plantas amazônicas.....	30
Tabela 3.	Atividade Anti- <i>P. falciparum</i> (cepa W2) de extratos e frações de plantas amazônicas.....	33
Tabela 4.	Atividade Anti- <i>P. falciparum</i> contra as cepas: D2, Dd2, K1 e Nigerian Strains de extratos e frações de plantas amazônicas.....	34
Tabela 5.	Atividade Anti- <i>P. falciparum</i> contra cepas: 3D7, FcM29, K1, W2 e Nigerian Strains, de compostos secundários isolados de plantas amazônicas.....	36
Tabela 6.	Atividade antileishmanial em células promastigotas de <i>Leishmanial</i> spp.....	42
Tabela 7.	Atividade antileishmanial em amastigotas intracelular de <i>Leishmanial</i> spp.....	46
Tabela 8.	Tabulação dos dados dos testes de toxicidade, antitoxicidade, mutagenicidade e antimutagenicidade (Concentrações em mg/mL).....	56
Tabela 9.	Tratamento, número total de células de <i>A. cepa</i> analisadas no ciclo celular em Interfase, prófase, metáfase, anáfase e telófase.....	57
Tabela 10.	Média \pm desvio padrão do número de Eritrócitos Policromáticos (PCE), Eritrócitos Normocromáticos (NCE) e da relação PCE/NCE em células da medula óssea de camundongos, submetidos a tratamento com extrato aquoso de <i>M. guianensis</i>	63
Tabela 11.	Atividade anti- <i>P. falciparum</i> (cepa W2) de eluatos e metabólitos secundários isolados de <i>M. guianensis</i>	86
Tabela 12.	Índice de seletividade primário de eluatos e Tingenina B isolado de <i>M. guianensis</i>	88

RESUMO

A espécie *Maytenus guianensis* é endêmica da Amazônia brasileira, sendo utilizada na medicina tradicional contra enfermidades como malária, leishmaniose e câncer. Acredita-se que essa ação farmacológica pode estar relacionada à presença de terpenóides ocorrentes no gênero *Maytenus*, visto que diversas pesquisas tem demonstrado o potencial antiparasitário e anticancerígeno desse gênero, o que justifica a realização do presente estudo que objetivou realizar uma análise genotóxica e antiparasitária de extratos e substâncias isoladas de *M. guianensis*. As análises da citotoxicidade e mutagenicidade do extrato aquoso foram realizadas pelos métodos de germinação dos meristemas, índice mitótico e micronúcleo em *Allium cepa*, enquanto os de genotoxicidade *in vivo* utilizaram as técnicas de ensaio cometa em sangue periférico, correlação eritrocitos policromáticos/ monocromáticos e ocorrência de micronúcleo em medula óssea de camundongos. O preparo dos eluatos e isolamento dos metabólitos secundários foram realizados por meio de cromatografia em coluna de vidro utilizando-se como fase fixa sílica gel. A identificação estrutural dos constituintes químicos foi realizada por meio de métodos espectroscópicos de ressonância magnética nuclear de hidrogênio-1 e carbono-13, uni e bidimensional, espectroscopia de massa e espectroscopia na região do infravermelho. Já para a avaliação da atividade anti-*Plasmodium falciparum* W2 e anti-*Leishmania amazonensis* utilizou-se os testes imunoenzimático anti-HRP2 e brometo de 3-metil-[4-5-dimetiltiazol-2-il]- 2,5 difeniltetrazólio, respectivamente. Observou-se que o extrato aquoso da entrecasca de *M. guianensis* em concentrações até dez vezes maiores que a utilizada na etnofarmacologia apresenta ação anticitotóxica e antimutagênica nos testes em *A. cepa*, além de efeitos antigenotóxicos em camundongos tratados de forma aguda. A investigação fitoquímica em *M. guianensis* levou ao isolamento de nove triterpenos, incluindo friedelanos, friedo-nor-oleanano, oleanano e ursano e um esteróide, sendo todos isolados pela primeira vez a partir desta espécie. Nos testes atiplasmodial e anteishmanicida o Eluato Hexânico da Casca (EHC), apresentou os melhores resultados entre os eluatos com $IC_{50}=11,26 \mu\text{g/mL}$ contra *P. falciparum* e inibição entre 90 a 100% das formas promastigotas de *L. amazonensis*, porém, este eluato apresentou citotoxicidade contra linhagem celular HepG2. Já entre os metabólitos isolados do EHC, o que apresentou melhor resultado contra *P. falciparum* foi o Tingenina B com $IC_{50}=7,19 \mu\text{g/mL}$, este que seguido do Tingenina + Tingenina B apresentam os melhores resultados contra promastigotas de *L. amazonensis*, com inibição ficando entre 80 a 90%. Constatou-se que a espécie *M. guianensis* possui potencial anticitotóxico, antimutagênico, antigenotóxico e antiparasitológico com atividade antiplasmodial e antileishmanial, sendo indicados estudos futuros para elucidação do mecanismo de ação para cada atividade e avaliação do potencial genotóxico dos eluatos e metabólitos secundários, a fim de potencializar a eficácia etnofarmacológica e minimizar os possíveis efeitos adversos.

Palavras-chave: *Maytenus guianensis*, Genotoxicidade, *Plasmodium falciparum* e *Leishmania amazonensis*.

ABSTRACT

Maytenus guianensis is an endemic species of Brazilian Amazon, being used in traditional medicine against illnesses such as malaria, leishmaniasis and cancer. Such pharmacological actions are believed to be related to the presence of terpenoids that occur in the genus *Maytenus*, since many researches have demonstrated the antiparasitic and anticancer potential of this genus, justifying the carrying out of the present study that aimed to perform genotoxic and antiparasitic analyses of extracts and substances isolated from *M. guianensis*. Both cytotoxicity and mutagenicity analyses of the aqueous extract were performed by the methods of meristems germination, mitotic indexes and micronuclei in *Allium cepa*, whilst in the *in vivo* genotoxicity analysis were used the techniques of comet assay in peripheral blood, correlation polychromatic/monochrome and occurrence of micronuclei in bone marrow of mice. The preparation of eluates and the isolation of the secondary metabolites were performed by glass column chromatography using silica gel as stationary phase. The structural elucidation of the chemical constituents was performed by spectroscopic methods of nuclear magnetic resonance of Hydrogen-1 and Carbon-13, uni and bidimensional, mass spectroscopy and Infrared region spectroscopy. For the evaluation of the anti-*Plasmodium falciparum* W2 and anti-*Leishmania amazonensis* activities were used the immunoenzymatic assay anti-HRP2 and 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide, respectively. It was found the aqueous extract of the bark of *M. guianensis* in concentrations until tenfold higher than that used in the ethnopharmacology presents anticytotoxic and antimutagenic actions for the assays in *A. cepa*, besides antigenotoxic effects in mice treated acutely. The phytochemical investigation in *M. guianensis* led to the isolation of nine triterpenes, including friedelanones, Friedo-nor-oleanane, oleanane and ursane and a steroid, wherein all of them were isolated for the first time from this species. In both antiplasmodial and antileishmanial assays the Hexanic Eluate of the Bark (HEB) presented the best results with $IC_{50}=11,26 \mu\text{g/mL}$ against *P. falciparum* and inhibition between 90 and 100% of *L. amazonensis* promastigotes, however this eluate showed cytotoxicity against cell line HepG2. Amongst the metabolites isolated from HEB, the compound that presented the best action against *Plasmodium falciparum* was Tingenone B with $IC_{50}=7,19 \mu\text{g/mL}$, wherein this compound, followed by Tingenone + Tingenone B presented the best results against *L. amazonensis* promastigotes, whose inhibition ranged from 80 to 90%. It was found the species *M. guianensis* has anticytotoxic, antimutagenic, antigenotoxic and antiparasitic potentials, being indicated further studies for the elucidation of the mechanisms of action for each of the activities observed and the evaluation of the genotoxic potential of the eluates and secondary metabolites, in order to improve the pharmacological efficacy and minimize the possible adverse effects.

Keywords: *Maytenus guianensis*, Genotoxicity, *Plasmodium falciparum* e *Leishmania amazonensis*.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
1.1	FAMÍLIA CELASTRACEAE.....	14
1.2	GÊNERO <i>Maytenus</i>	15
1.3	TERPENÓIDES.....	23
2	OBJETIVOS.....	25
2.1	OBJETIVO GERAL.....	26
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
3	CAPÍTULO I. Revisão Bibliográfica: Etnofarmacologia Antimalárica na Amazônia Brasileira.....	27
4	CAPÍTULO II. Revisão Bibliográfica: Plantas da Amazônia Brasileira com Potencial Antileishmanial <i>In Vitro</i>.....	40
5	CAPÍTULO III. Análise Citotóxica, Mutagênica e Genotóxica do Extrato Aquoso de <i>Maytenus guianensis</i> Klotzsch Ex Reissek (Celastraceae) Chichuá (Xixuá) Amazônico.....	49
6	CAPÍTULO IV. Fracionamento, Isolamento e Caracterização dos Constituintes Químicos de <i>Maytenus guianensis</i> Klotzsch ex Reissek (Celastraceae) da Floresta Amazônica.....	69
7	CAPÍTULO V. Triagem da Ação Antiplasmodial e Antileishmanial <i>in vitro</i> de Compostos e Metabólitos Secundários Isolados de <i>Maytenus guianensis</i> Klotzsch ex Reissek (Celastraceae) Chichuá Amazônico.....	75
8	CONCLUSÕES GERAIS.....	91
	REFERÊNCIAS.....	93
	ANEXOS.....	120

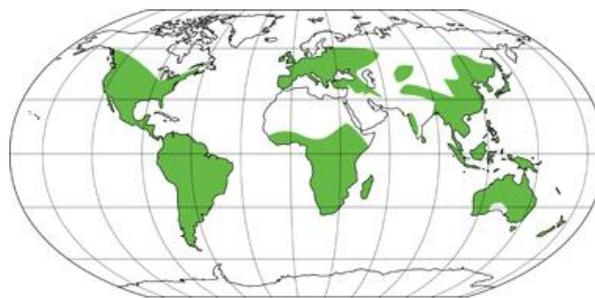
INTRODUÇÃO

1.1 FAMÍLIA CELASTRACEAE

A utilização de plantas com fins medicinais para tratamento ou profilaxia de doenças é uma das mais antigas formas de prática medicinal na humanidade (DUTRA, 2009), porém, uma grande parte das plantas de uso medicinal ainda é desconhecida pela ciência, e dados mostram que mais de 95% das espécies endêmicas do Brasil ainda não têm seus princípios ativos identificados (SANTOS, 2009), representando um grande potencial farmacológico e econômico a serem explorados, em especial das espécies vegetais amazônicas (CECHINEL FILHO; ROSENDO, 1998), visto que muitas ainda nem foram catalogadas pela ciência (ABREU et al., 2001) e podem possuir novas entidades químicas, essas que são ponto de partida para a síntese de drogas mais específicas e eficientes (LANG et al., 2008).

Na Amazônia, existem inúmeras espécies de plantas que possuem propriedades medicinais (OSAKADA, 2009), entre elas as pertencentes à família Celastraceae que é composta por 98 gêneros e aproximadamente 1264 espécies (FONSECA et al., 2007), que são distribuídas em diversas partes do mundo, particularmente nas regiões tropicais e subtropicais, incluindo o norte da África, América do Sul e Ásia (Figura 1) (MOHAMED; PERWEZ, 2014; SPIVEY; WESTON; WOODHEAD, 2002; DUARTE et al., 2010; HURTADO, 2013).

Figura 1. Distribuição mundial da família Celastraceae.



Fonte: Laboratório de Sistemática de Plantas Vasculares (LSPV, 2015).

A família Celastraceae possui espécies com grande importância terapêutica, pois apresentam diversas atividades farmacológicas, tais como: antiulcerogênica, inseticida, imunossupressora, antirreumática, antibacteriana e anticancerígena (FONSECA et al., 2007) e devido a isso, espécies dessa família tem sido objeto de inúmeras investigações fitoquímicas, e seus metabólitos secundários isolados tem demonstrado boa atividade biológica

(FORMIGONI et al., 1991; FONSECA et al., 1997; LIÃO et al., 1997; ALLISON et al., 2001; CORSINO et al., 2003; JORGE et al., 2004; ALVARENGA; FERRO, 2006; KVIST et al., 2006; FONSECA et al., 2007; ALMEIDA et al., 2010; DING et al., 2010; LIMA et al., 2010; ANTONISAMY; DURAIPANDIYAN; IGNACIMUTHU, 2011; KENNEDY et al., 2011; SANTOS et al., 2013), dentre eles podemos citar os triterpenos pentacíclicos friedelânicos e quinonametídeos, sesquiterpenos, secofriedelanos, esteroides, derivados agarofurânicos, glicosídeos, proantocianidinas, flavonóides glicosilados, alcaloides piridínicos sesquiterpênicos e catequinas (CORSINO et al., 1988; CHAVES et al., 1999; CORSINO et al., 2003; DA SILVA et al., 2008; SOUSA et al., 2012; HURTADO, 2013).

No Brasil, a família Celastraceae é representada por quatro gêneros: *Austroplenckia*, *Franhoferia*, *Maytenus* e *Salacia* (DE OLIVEIRA et al., 2006). O gênero *Maytenus* é o maior da família possuindo cerca de 225 espécies (NEGRI; POSSAMAI; NAKASHIMA, 2009; ALMEIDA et al., 2010), que ocorrem particularmente nas regiões tropicais e subtropicais como China, África, Paraguai, Brasil, Argentina e Uruguai, e em regiões do sul da Arábia Saudita (MOHAMED; PERWEZ, 2014).

1.2 GÊNERO *Maytenus*

O gênero *Maytenus* está inserido na subfamília Celastroideae, sendo atualmente reconhecidas aproximadamente 80 espécies distribuídas por todo território brasileiro (JOFFILY; VIEIRA, 2005).

Nos últimos anos, tem havido um aumento significativo no interesse em plantas do gênero *Maytenus*, especialmente no Brasil, que apresenta quase 40% das espécies conhecidas (CARVALHO-OKANO; LEITÃO-FILHO, 2004), que ocorrem no Norte (Acre, Amazonas, Amapá, Pará, Rondônia, Roraima), Nordeste (Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Sergipe), Centro-Oeste (Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso), Sudeste (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo), Sul (Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina), sendo encontradas na Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica e Pampa (LOMBARDI; GROppo; BIRAL, 2015), onde algumas são utilizadas na medicina tradicional, para o tratamento de diversas enfermidades conforme pode ser observado na Tabela 1.

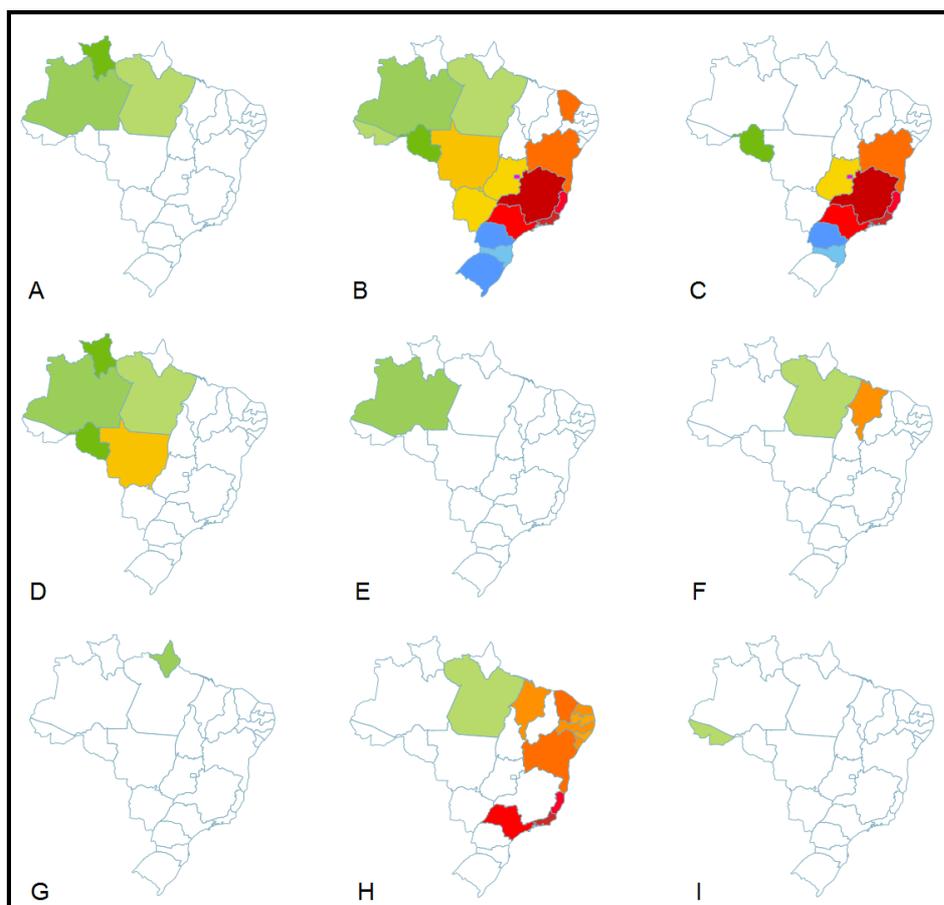
Tabela 1. Algumas espécies do gênero *Maytenus* ocorrentes no Brasil, utilizadas na medicina tradicional.

Espécie	Ação descrita pela medicina tradicional	Referências
<i>Maytenus aquifolium</i>	Antiúlcera e analgésico.	SOUZA-FORMIGONI et al., 1991; COELHO; DI STASI; VILEGAS, 2003; TIBERTI et al., 2007; NIERO; ANDRADE; CECHINEL FILHO, 2011.
<i>Maytenus ebenifolia</i>	Tratamento de reumatismo, hemorróidas, artrite, resfriados, disenteria, erupções da pele, inchaço dos rins, bronquite e infecções femininas, relaxante muscular, analgésicos, anticancerígeno, afrodisíaco e tônico estimulante.	ITOKAWA et al., 1993; MACARI; PORTELA; POHLIT, 2006; Revilla, 2002.
<i>Maytenus ilicifolia</i>	Antiúlcera, diurético, laxante, antitumoral, digestivo, abortivo, anticoncepcional, tratamento de feridas, antiséptico, antiasmático, analgésicos, anticancerígeno, antiinflamatórios e acelerador de menstruação.	ARENAS; AZORERO, 1977; MONTANARI; CARVALHO; DOLDER, 1988; CORDEIRO; VILEGAS; LANÇAS, 1999; MONTANARI; BEVILACQUA, 2002; JORGE et al., 2004; VELLOSA et al., 2006; PESSUTO et al., 2009; SANTOS-OLIVEIRA; COULAUD-CUNHA; COLAÇO, 2009; NIERO; ANDRADE; CECHINEL FILHO, 2011.
<i>Maytenus guianensis</i>	Tratamento de reumatismo, hemorróidas, artrite, resfriados, disenteria, erupções da pele, inchaço dos rins, bronquite e infecções femininas, relaxante muscular, analgésicos, anti-inflamatório, antiparasitário, anticancerígeno, afrodisíaco e tônico estimulante.	REVILLA, 2002; BORRÁS, 2003; MACARI; PORTELA; POHLIT, 2006; FONSECA et al., 2007; PRATA; MENDONÇA, 2009.
<i>Maytenus obtusifolia</i>	Antiúlcera, Ansiolíticos, antitumoral e antiinflamatório.	MOTA et al., 2008; NIERO; ANDRADE; CECHINEL FILHO, 2011.
<i>Maytenus rigida</i>	Analgésico, antiinfecioso e antiinflamatório.	MOTA et al., 2008; NIERO; ANDRADE; CECHINEL FILHO, 2011.
<i>Maytenus robusta</i>	Antiúlcera.	NIERO et al., 2006; ANDRADE et al., 2007; ANDRADE et al., 2008; NIERO; ANDRADE; CECHINEL FILHO, 2011.
<i>Maytenus salicifolia</i>	Antialérgico e alívio de coceiras.	VALLADÃO et al., 2009; NIERO; ANDRADE; CECHINEL FILHO, 2011.
<i>Maytenus truncata</i>	Antiúlcera, antiinflamatório e contra doenças do útero.	FONSECA et al., 1997; SALAZAR et al., 2001; SILVA et al., 2005; FONSECA et al., 2007; NIERO; ANDRADE; CECHINEL FILHO, 2011.

Fonte: Adaptado de: (NIERO; ANDRADE; CECHINEL FILHO, 2011).

Na região Norte, são descritas 11 espécies endêmicas: *Maytenus ebenifolia*, *Maytenus floribunda*, *Maytenus gonoclada*, *Maytenus guyanensis*, *Maytenus laevis*, *Maytenus laurina*, *Maytenus sapotiformis*, *Maytenus myrsinoides*, *Maytenus oblongata* Reissek, *Maytenus obtusifolia* e *Maytenus sprucei* (LOMBARDI; GROppo; BIRAL, 2015) e a distribuição das mesmas no Brasil pode ser observado na Figura 2.

Figura 2. Distribuição das espécies do gênero *Maytenus* ocorrentes na região Norte.

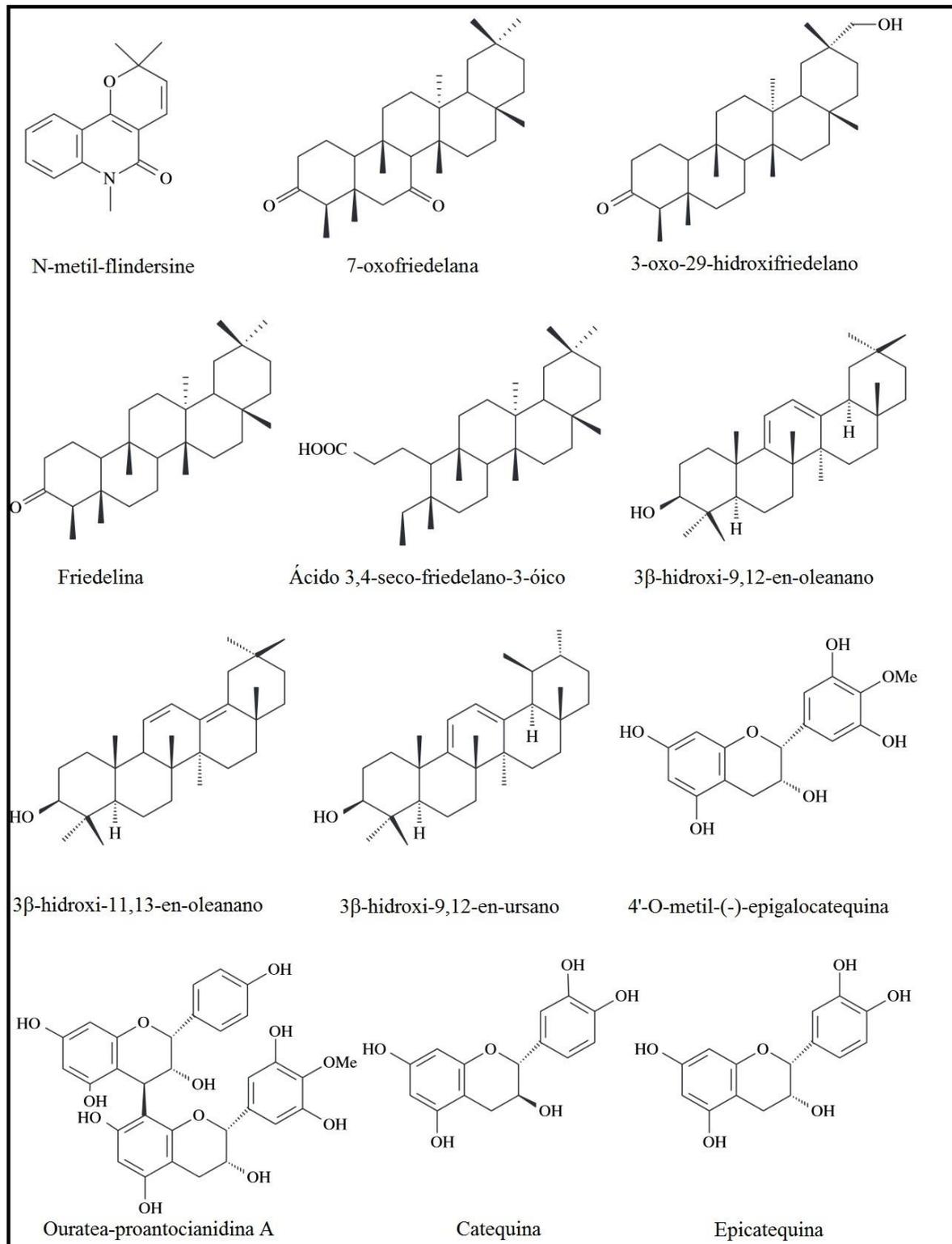


A: *M. ebenifolia*; B: *M. floribunda*; C: *M. gonoclada*; D: *M. guianensis*; E: *M. laevis*, *M. laurina* e *M. sapotiformis*; F: *M. myrsinoides*; G: *M. oblongata*; H: *M. obtusifolia*; I: *M. sprucei*. Cores verdes: Região Norte; Cores amarelas: Região Centro-Oeste; Cores laranjas: Região Nordeste; Cores vermelhas: Região Sudeste; Cores Azuis: Região Sul. Fonte: (LOMBARDI; GROppo; BIRAL, 2015).

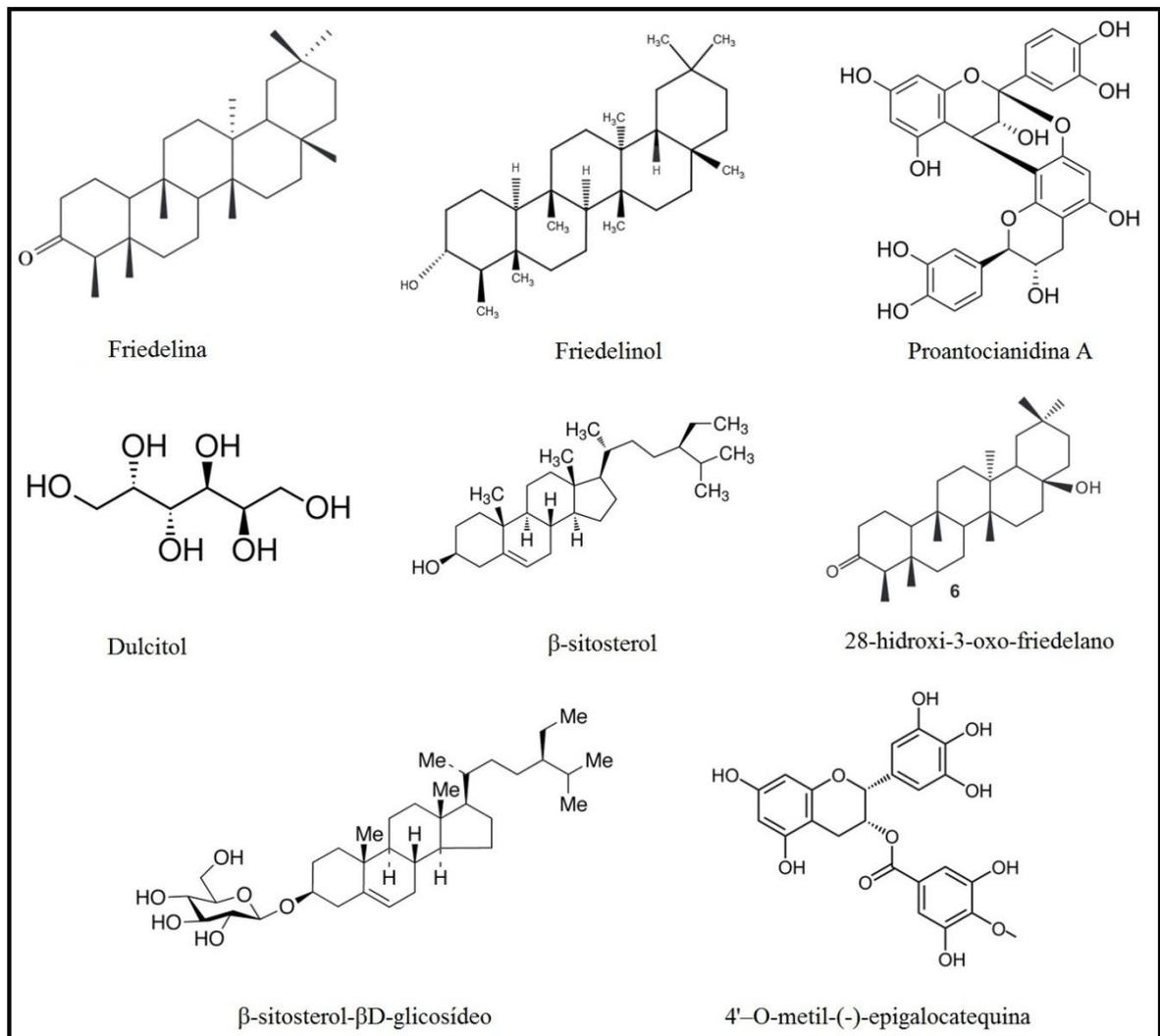
As espécies do gênero *Maytenus* são conhecidas por apresentarem sesquiterpenos, triterpenos fieno-oleanano, alcalóides, flavonóides, taninos e ácidos fenólicos (MARTINS et al., 2012; DA SILVA et al., 2008; LHINHATRAKOOL et al., 2011; DE SOUZA et al., 1986).

Dentre as espécies encontradas na região Norte, sete têm estudos fitoquímicos realizados *M. obtusifolia* (Figura 3), *M. floribunda* (Figura 4), *M. ebenifolia* (Figura 5), *M. gonoclada* (Figura 6), *M. myrsinoides* (Figura 7), *M. laevis* (Figura 8) e *M. guianensis* (Figura 9), tendo sido isolamento diversos metabólitos secundários (PINHEIRO, 1980; GONZALEZ et al., 1982; BAUDOUIN et al., 1984; DE SOUSA et al., 1986; ITOKAWA et al., 1993; SHIROT et al., 1998; SALAZAR; SILVA; SOUSA, 1999; PIACENTE; TOMMASI; PIZZA, 1999; MACARI et al., 2004; NAKAGAWA et al., 2004; DA SILVA et al., 2008; SILVA et al., 2009; HURTADO, 2013).

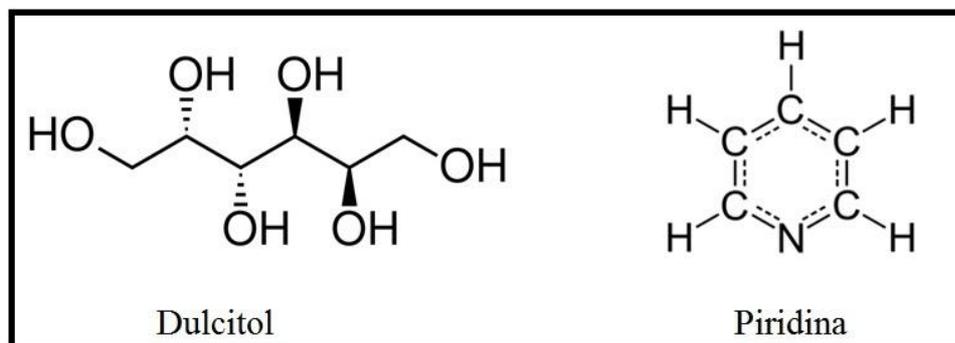
Figura 3. Metabólitos secundários isolados de *M. obtusifolia*.



Fonte: (DA SILVA et al., 2008).

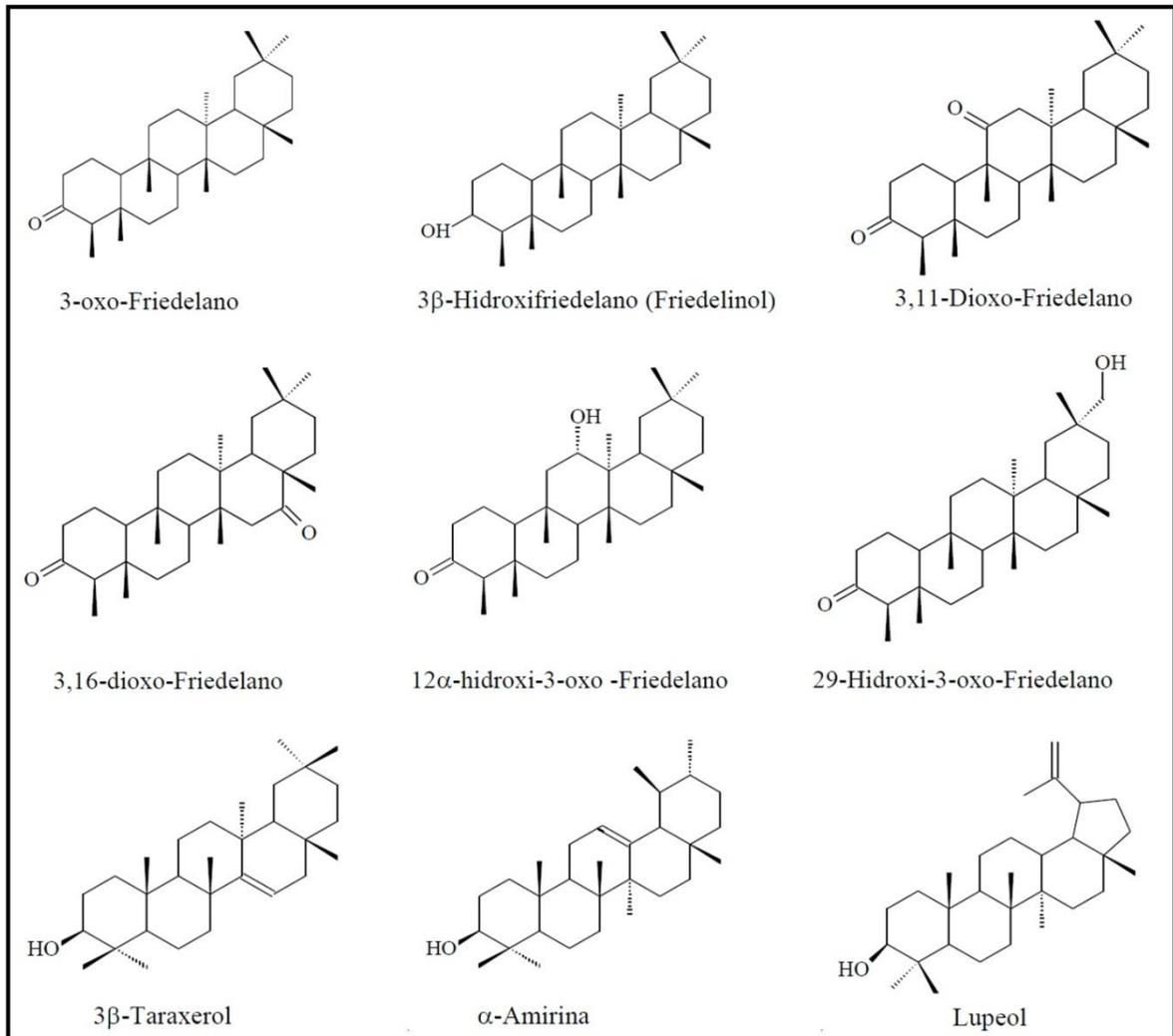
Figura 4. Metabólitos secundários isolados de *M. floribunda*.

Fonte: (SALAZAR; SILVA; SOUSA, 1999).

Figura 5. Metabólitos secundários isolados de *M. ebenifolia*.

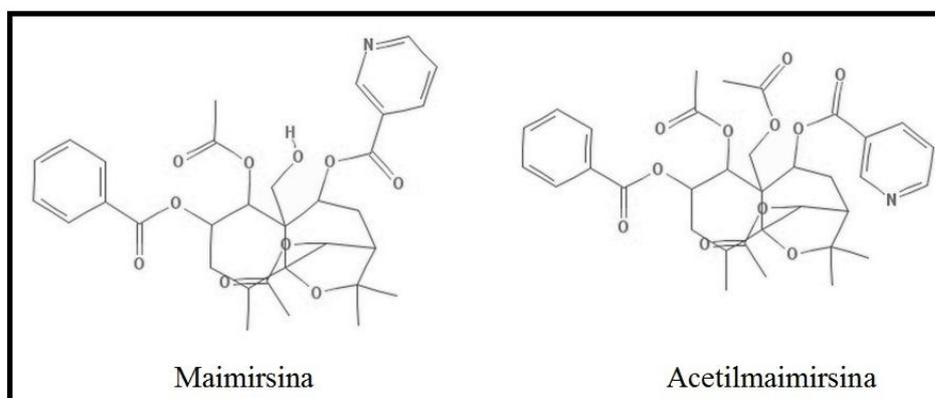
Fonte: (ITOKAWA et al., 1993; SHIROT et al., 1998).

Figura 6. Metabólitos secundários isolados de *M. gonoclada*.

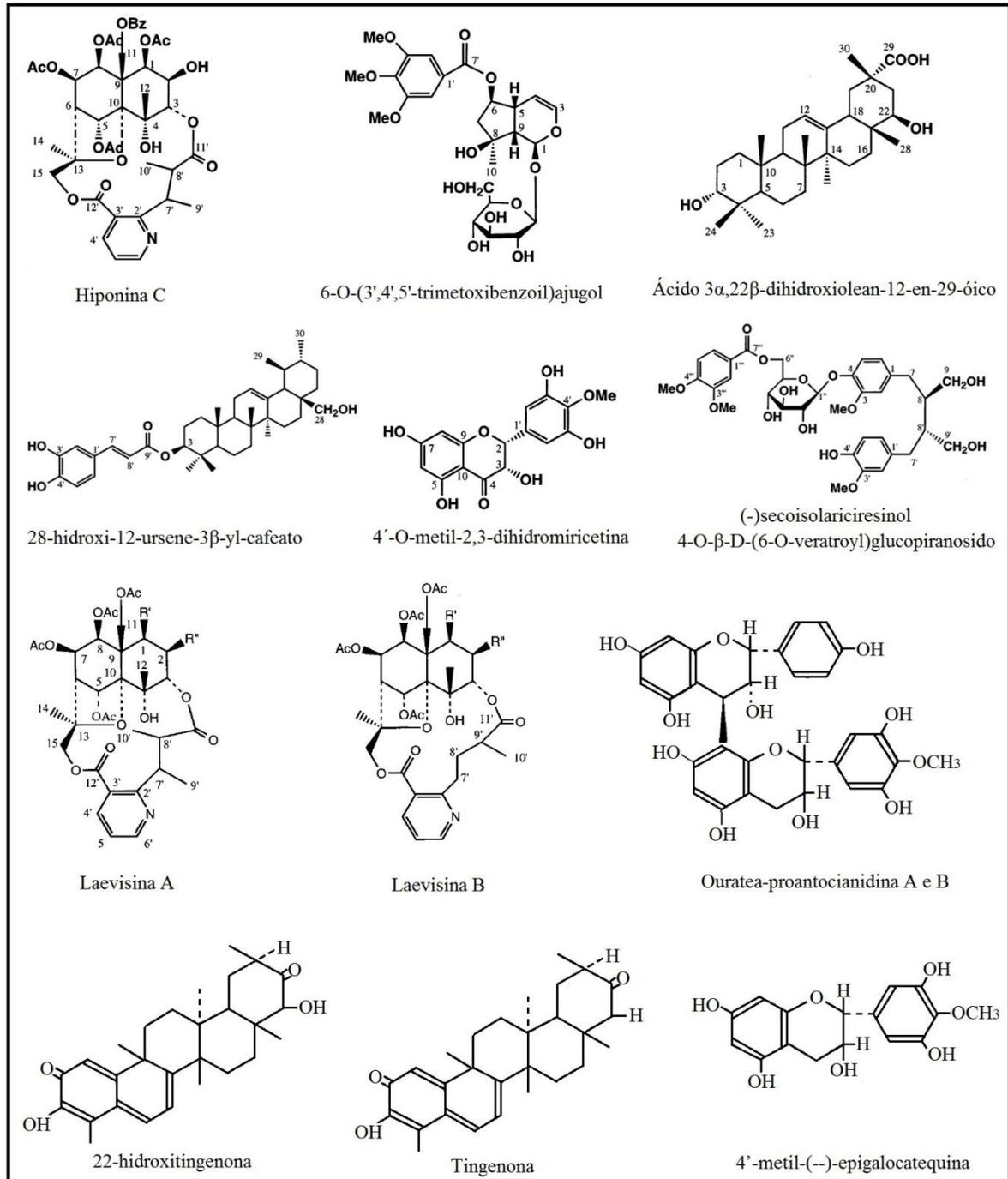


Fonte: (HURTADO, 2013).

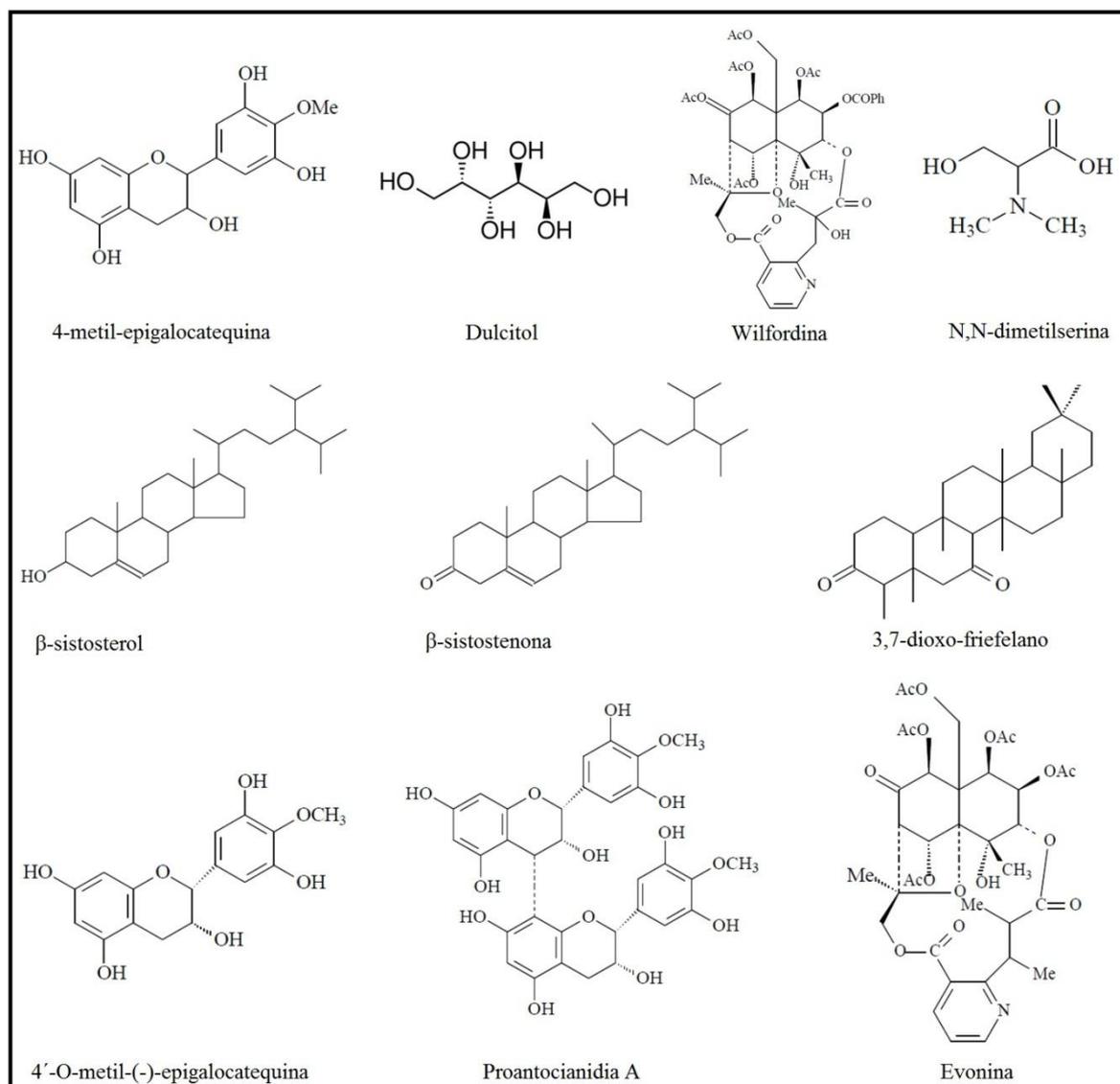
Figura 7. Metabólitos secundários isolados de *M. myrsinoides*.



Fonte: (BAUDOIN et al., 1984).

Figura 8. Metabólitos secundários isolados de *M. laevis*.

Fonte: (GONZALEZ et al., 1982; PIACENTE; TOMMASI; PIZZA, 1999; NAKAGAWA et al., 2004).

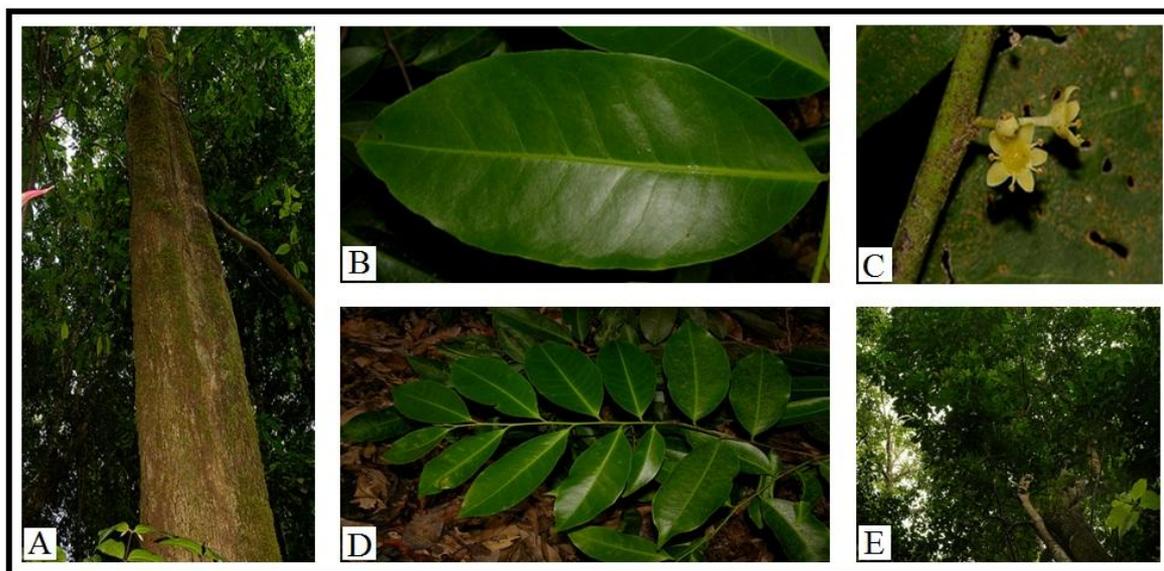
Figura 9. Metabólitos secundários isolados de *M. guianensis*.

Fonte: (PINHEIRO, 1980; Souza et al., 1986; MARCARI et al., 2004; HURTADO, 2013).

Dentre as espécies do gênero *Maytenus* ocorrentes da região Norte, com estudos fitoquímicos realizados, recebe destaque a espécie *M. guianensis*, pois suas raízes e caule são utilizados na medicina tradicional com suposto efeito analgésico, relaxante muscular, cicatrizante, inseticida, imunossupressor, antiinflamatório, antiulcerogênico, antireutmático, antidiarréico, antibacteriano, antifúngico, antihelmíntico, antiprotozoário, antitumoral, afrodisíaco e ginecológico (REVILLA, 2002; BORRÁS, 2003; MACARI; PORTELA; POHLIT, 2006; FONSECA et al., 2007; PRATA; MENDONÇA, 2009), demonstrando um grande potencial etnofarmacológico a ser explorado, o que justifica a realização de estudos tendo essa espécie como matéria prima.

A espécie *M. guianensis* (Figura 10) é uma árvore de médio porte endêmica de terra firme na Amazônia, conhecida como chichuá, xixuá, chuchahuasi, chucchu huashu, chuchuasi e chuchasha (REVILLA, 2002; BORRÁS, 2003; PRATA; MENDONÇA, 2009).

Figura 10. Espécie *M. guianensis*.



A) Tronco; B) Folha; C) Flor; D) Distribuição das folhas; E) Copa. Fonte: (AGUILAR, 2015).

Acredita-se que a provável ação antiparasitária e anticancerígena descrita popularmente para a espécie *M. guianensis*, esteja relacionada à presença de terpenóides ocorrentes no gênero *Maytenus* (PINHEIRO, 1980; GONZALEZ et al., 1982; BAUDOIN et al., 1984; DE SOUSA et al., 1986; ITOKAWA et al., 1993; SHIROT et al., 1998; SALAZAR; SILVA; SOUSA, 1999; PIACENTE; TOMMASI; PIZZA, 1999; MACARI et al., 2004; NAKAGAWA et al., 2004; DA SILVA et al., 2008; SILVA et al., 2009; SANTOS-OLIVEIRA; COULAUD-CUNHA; COLAÇO, 2009; NIERO; ANDRADE; CECHINEL FILHO, 2011; HURTADO, 2013).

1.3 TERPENÓIDES

Diversos estudos tem demonstrado o potencial antiparasitário dos terpenóides contra malária (RODRIGUES-GOULART et al., 2004; NATHAN; HISHAM; JAYAKUMAR, 2008; MAYER et al., 2009; SILVA et al., 2013; SANTOS et al., 2013), leishmaniose (TELES et al., 2011; BARROS et al., 2013; HURTADO, 2013; SILVA et al., 2014; LIMA, 2014) e

tripanossomiase americana (GUIMARÃES; FARIA, 2007; BEZZERA; MENEGUETTI; CAMARGO, 2012; GOIJMAN et al., 1985; DUARTE et al., 2002; FRITIS et al., 2013; FERREIRA et al., 2013; LIMA, 2014). Resultados animadores também tem relatado potencial anticancerígeno dos terpenóides (GONZALEZ et al., 2000; MAIMONE; BARAN, 2007; PADUCH et al., 2007; SALMINEN et al., 2008; GANATRA; SUCHAK, 2012; XU et al., 2013; PRABHU et al., 2013).

Dentro dos terpenóides os triterpenos estão entre os grupos mais estruturalmente diversificados (DOMINGO et al., 2009), podendo ser classificados em acíclicos, tetracíclicos e pentacíclicos (BARROS et al., 2013; XU et al., 2004), existindo atualmente mais de 40 mil estruturas, possuindo um potencial farmacológico a ser explorado (ROBERTS et al., 2007).

Mesmo que ainda não tenha sido totalmente elucidado o papel biológico dos terpenóides (GERSHENZON et al., 2007), estudos mostram que estes possuem diversas funções no reino vegetal, dentre elas defender as espécies contra predadores, patógenos e competidores (ROBERTS et al., 2007).

Dentre os triterpenos ocorrentes no gênero *Maytenus*, recebem destaque os dímeros com atividade antimicrobiana (GONZÁLEZ et al., 1996), lupânicos com atividade anti-inflamatória (REYES et al., 2006), friedelânicos com atividade antiulcerogênica e antimicrobiana (ANDRADE et al., 2008) e sesquiterpenos com atividade citotóxica, antitumoral (SHIROTA et al., 1994; MORITA et al., 2008) e antiparasitária (DELGADO-MÉNDEZ et al., 2008) atuando como anti-helmíntico (MENA-REJÓN et al., 2007) e tripanocida (DUARTE et al., 2002), o que estimula a realização de estudos com plantas que contenham esses metabólitos em seus constituintes químicos, principalmente da família Celastraceae e do gênero *Maytenus*, estas que apresentaram uma ampla ocorrência dos mesmos e que justifica a realização do presente estudo.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar uma análise genotóxica e antiparasitária de extratos e substâncias isoladas de *Maytenus guianensis* klotzsch ex Reissek (Celastraceae), Chichuá (Xixuá) amazônico.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a citotoxicidade e mutagênicidade do extrato aquoso de *M. guianensis*;
- Verificar a genotoxicidade aguda *in vivo* do extrato aquoso de *M. guianensis*;
- Realizar estudo fitoquímico para o fracionamento e isolamento de metabólitos secundários de *M. guianensis*;
- Avaliar a atividade anti-*Plasmodium falciparum* (cepa W2) de eluatos e substâncias isoladas de *M. guianensis*;
- Investigar a ação anti-*Leishmania amazonensis* de eluatos e substâncias isoladas de *M. guianensis*.

3. CAPÍTULO I

Revisão Bibliográfica: Etnofarmacologia Antimalárica na Amazônia Brasileira

Esse capítulo é referente aos dados do artigo de revisão bibliográfica:

Antimalarial ethnopharmacology in the Brazilian Amazon

**Aceito para publicação na Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada
(Anexo I)**



3.1 FÁRMACOS ANTIMALÁRICOS

Dados relatam que dos 1.535 novos fármacos registrados entre 1975 e 2004 apenas 1% foram destinados às doenças tropicais (DIAS; DESSOY, 2009; SANTOS et al., 2012). Os números revelam uma política de pesquisa excludente, na qual apenas 10% das despesas mundiais com pesquisa em saúde são gastos em doenças que acometem 90% da carga global, o desafio então é fornecer às populações acometidas alternativas para este tratamento que, na maioria dos casos, se apresenta de forma inadequada (SOBRINHO et al., 2007).

Os plasmódios maláricos tem um complicado ciclo biológico, por isso a malária precisa ser tratada com associações de medicamentos, sendo que o esquema terapêutico deve estar atuando em cada fase desse ciclo e certos critérios devem ser considerados, tais como o tipo de plasmódio, a classificação clínica do paciente e o grupo ao qual o mesmo faz parte, estes aspectos determinarão a necessidade de um tratamento diferenciado para cada situação (OSORIO-DE-CASTRO et al., 2011).

Os primeiros fármacos antimaláricos foram criados na década de 1940, sendo derivados de produtos naturais ou compostos sintéticos (SCALERCIO, 2010), tendo como medicamento mais antigo utilizado no tratamento da malária a quinina, que atua como um esquizonticida eritrocitário com ação rápida, atuando também sobre gametócitos de *P. vivax*, *P. ovale* e *P. malariae*, não tendo ação sobre esquizontes tissulares ou gametócitos de *P. falciparum* (GOMES et al., 2011).

A quinina foi descartada após a introdução dos derivados sintéticos, sendo reintroduzida quando ocorreu o aparecimento de cepas resistentes, era utilizada em infecções por *P. falciparum* resistente a cloroquina, assim como no tratamento da malária severa, onde também pode ser utilizada quinidina que se mostrou mais eficaz, porém, mais tóxico que a quinina (SILVA et al., 2005).

A cloroquina possui poucos efeitos adversos quando conduzida para quimioprofilaxia, sendo também considerada segura para gestantes, entretanto ao ser usado com doses altas no tratamento agudo, podem ocorrer náuseas, vômitos, tonteira, visão turva, cefaleia, sintomas de urticária e retinopatias (CABRAL, 2010).

Devido ao aumento da resistência às drogas antimaláricas como a cloroquina, quinina e mefloquina houve a elevação do número de casos em alguns países de clima tropical e este fato tem sido uma ameaça para o sistema de saúde local, partindo deste pressuposto novos fármacos têm sido testados em todo o mundo com o objetivo de que seja evitada a resistência

ao *P. falciparum*, dentre estes medicamentos está o Arteméter em conjunto com o lumefantrina, que já foi aprovada para uso em mais de 80 países, não provocando efeitos graves em 99% dos pacientes que são portadores da malária provocada pelo *P. falciparum*, os outros 1% apresentaram tosse, diarreia, vômito e anemia (PINHEIRO, 2013).

Entre os fármacos mais recentes para o controle da malária, encontra-se a artemisinina e seus derivados, eles atuam de forma rápida na destruição dos esquizontes sanguíneos impedindo a formação de gametócitos, esses derivados geralmente são usados em combinação com outras drogas de vida longa, entre elas a mefloquina, piperaquina, amodiaquina, formando um conjunto de combinações terapêuticas instituídas por Artemisinin Combined Therapy (TEÓFILO, 2008).

Outro fármaco que tem sido utilizado em diversos países é a combinação de sulfadoxina e pirimetamina, entretanto os níveis de resistência a esta droga tem aumentado e está associada a mutações pontuais em dois genes: DHPS e DHFR (TEÓFILO, 2008).

A mefloquina é outro fármaco que tem sido utilizada para combater o *P. falciparum* resistente à cloroquina, entretanto, este fármaco apresenta alguns efeitos colaterais como complicações gastrointestinais, tonturas e efeitos psicológicos, e mesmo esses efeitos sendo temporários o seu uso não é recomendado para tratamento de pacientes com histórico de epilepsia ou desordens psiquiátricas (FRANÇA, 2008).

Também podemos citar a amodiaquina derivada do fenantreno e a hidrox-cloroquina como fármacos utilizados para o tratamento de malária causada por cepas de *P. falciparum* resistentes à cloroquina (CRC), entretanto, eles são menos efetivas que as drogas citadas anteriormente e mais tóxicas que a cloroquina, efeitos semelhantes também são observados com a halofantrina, além da ocorrência de resistência cruzada com a mefloquina (FRANCA, 2008).

Para o controle da malária é necessário que sejam descobertos novos compostos e uma vacina eficaz, dentro deste contexto pesquisas estão sendo desenvolvidas com base no conhecimento empírico das populações tradicionais da região amazônica brasileira para a busca de novos fármacos antimaláricos.

3.2 ETNOFARMACOLOGIA ANTIMALÁRICA

Na região amazônica são descritas 76 espécies de plantas com possível atividade antimalárica sendo distribuídas em 32 famílias botânicas. Entre estas, 26 espécies, pertencentes a 12 famílias, demonstraram atividade *Anti-Plasmodium falciparum in vitro*, onde entre os extratos brutos, frações e metabólitos secundários isolados, 66 compostos foram ativos contra as cepas: 3D7, W2, FcB1, K1, Dd2, D2, D6, F32, FcM29 e Nigerian Strains de *P. falciparum*.

3.2.1 Atividade Anti-*P. falciparum* de extratos e frações

3.2.1.1 Cepa sensível à cloroquina

A cepa 3D7 de *P. falciparum*, que teve seu genoma sequenciado em 2002 (GARDNER et al., 2002) é uma das cepas sensíveis a cloroquina (CSC), assim como as cepas D6 e F32. Na presente revisão foram encontrados 9 extratos e duas frações (com atividade contra a cepa 3D7) preparadas a partir de 11 espécies pertencentes a cinco famílias botânicas, conforme pode ser observado na Tabela 2.

Tabela 2. Atividade Anti-*P. falciparum* (cepa 3D7) de extratos e frações de plantas amazônicas.

Família	Espécie	Amostra	Atividade antiplasmódica (µg/mL)
Apocynaceae	<i>Aspidosperma rigidum</i>	Extrato (diclorometano)	1,0
		Caule	***
	<i>Aspidosperma spruceanum</i>	Extrato (diclorometano)	6,0
		Caule	***
	<i>Aspidosperma parvifolium</i>	Extrato (etanol)	20,5
		Entrecasca	**
	<i>Aspidosperma cylindrocarpon</i>	Extrato (etanol)	39,0
		Cerne	**
<i>Aspidosperma excelsum</i>	Extrato (etanol)	42,0	
	Entrecasca	**	
<i>Aspidosperma rigidum</i>	Extrato (etanol)	48,0	
	Caule	**	
<i>Aspidosperma spruceanum</i>	Extrato (etanol)	100,0	
	Caule	*	
Asteraceae	<i>Bidens pilosa</i>	Fração (butanol) Folhas e Raiz	50,0 **
Celastraceae	<i>Maytenus guyanensis</i>	Fração (hexano) Entrecasca	0,3 ***
Rutaceae	<i>Esenbeckia febrifuga</i>	Extrato (etanol) Caule	21,0 **
Verbenaceae	<i>Lantana cujabensis</i>	Extrato (etanol) Folha e Caule	23,3 **

IC₅₀: Concentração inibitória de 50% da população em teste: IC₅₀ atividade baixa *(IC₅₀>100); IC₅₀ atividade moderada ***(10<IC₅₀>100); IC₅₀ atividade alta (IC₅₀≤10). Fonte: (BRANDÃO et al., 1997; OKUNADE; LEWIS, 2004; KVIST et al., 2006; DOLABELA, 2007; MARIATH et al., 2009; DOLABELA et al., 2008; HURTADO, 2013; BORGES et al., 2013; DE PAULA, 2014).

As amostras que apresentaram melhores resultados foram à fração hexânica da entrecasca de *M. guyanensis*, e o extrato diclorometano do caule de *A. rigidum*.

Atividade contra cepas de *P. falciparum* já foi observada em estudos utilizando espécies do gênero *Maytenus*, onde o extrato aquoso e metanólico de *M. undata*, apresentaram o $IC_{50} < 10 \mu\text{g/mL}$, tanto para a cepa D6 (CSC) e W2 (CRC) (MUTHAURA et al., 2007). Acredita-se que a ação antiparasitária das espécies desse gênero é devido principalmente a ocorrência de triterpenos friedelanos (MUHAMMAD et al., 2000), como 3-oxo-friedelano, 3 β -Hidroxifriedelano, 3-oxo-16 β -hidroxifriedelano que já foram isolados da espécie *M. guyanensis* (LIMA et al., 2013; HURTADO, 2013) e de outras espécies do mesmo gênero (NOZAKI et al., 1986).

A espécie *A. rigidum*, pertence à família Apocynaceae, que é amplamente citada em tratamentos de febre e malária (BRANDÃO et al., 1992, OLIVEIRA et al., 2011, COUTINHO et al., 2013), sendo também citada com ação antibacteriana contra *Escherichia coli* (MENESES-PEREIRA et al., 2006) e atividade antileishmaniose (FERREIRA et al., 2004; TANAKA et al., 2007;). Do gênero *Aspidosperma* já foram isolados os alcaloides: β -ioimbina (OH-17em β), 10-metoxigeissoschizol, ramiflorinas A e B (MARQUES et al., 1996; OLIVEIRA et al., 2009) e isositsiriquina (OLIVEIRA et al., 2001), que em combinação ou de maneira isolada podem ser os responsáveis pela ação antiparasitária da espécie.

Também foram descritas a ação antiplasmódica das espécies *A. megalocarpon* e *A. oblongum*, contra as cepas F32 e D6 respectivamente. O extrato metanólico da espécie *A. megalocarpon*, apresentou resultado moderado com $IC_{50} = 25,0 \mu\text{g/mL}$ (WENIGER et al., 2001), e ação alta contra a cepa D2 (CRC) (resultado detalhado na Tabela 4 e discutido posteriormente), dessa espécie também foram testados a ação antiplasmodial dos seguintes metabólitos: aspidolimidina, aspidoalbina e fendlerina (MITAINE et al., 1998). Os resultados e discussão sobre os mesmos são apresentados no tópico sobre ação de metabólitos secundários isolados. Já o extrato etanólico da entrecasca de *A. oblongum*, apresentou ação antiplasmódica alta com $IC_{50} = 0,85 \mu\text{g/mL}$ (CABRAL et al., 1993), essa espécie também foi a que apresentou o melhor resultado contra a cepa W2 detalhada na Tabela 2 e discutida no tópico seguinte.

3.2.1.2 Cepas resistentes à cloroquina

As cepas W2 e FcB1 de *P. falciparum* (CRC), são utilizadas para procura de fármacos efetivos contra cepas resistentes as drogas utilizadas, principalmente a cloroquina.

Foram encontrados 10 extratos e uma fração (com atividade contra a cepa W2) preparados a partir de 9 espécies pertencentes a quatro famílias botânicas. Já contra a cepa FcB1, foram encontrados dois extratos e 12 frações, preparados a partir de 5 espécies pertencentes a quatro famílias botânicas, conforme pode ser visto na Tabela 3.

As espécies *A. oblongum* e *A. spruceanum*, assim como outras da família Apocynaceae, apresentam principalmente alcaloides entre seus metabólitos secundários, e entre esses podemos citar para a espécie *A. oblongum*: 10-methoxy-17-epialloyohimbine, 19,20-dehydro-P-yohimbine, 3,4-dehydro- β yohimbine, p-yohimbine oxindole, p-yohimbine pseudoindoxyle, pyohimbine N-oxide, 10-methoxy-P-yohimbine, 10-methoxy-a-yohimbine, 19,20-dehydro-a-yohimbine, aricine pseudoindoxyle, methoxy antirhine, 10-methoxy sirsirikine, tetrahydro-sirsirikine (ROBERT et al., 1983) e para *A. spruceanum*: spruceanumines A, spruceanumines B, aspidospermidine, demethoxypalosine, aspidocarpine, aspidolimine, fendlerine, aspidolimidine, obscurinervidine e obscurinervine (OLIVEIRA et al., 2009). Acredita-se que a mistura desses metabólitos são responsáveis pela atividade antimalárica contra a cepa W2.

Os melhores resultados encontrados contra a cepa FcB1, foram de diferentes frações da espécie *C. sylvestris*, que é caracterizada pela ocorrência de substâncias de interesse como: cumarinas, flavonóides, lignanas e diversos diterpenos (YAMAGUSHI et al., 2011). E além da atividade antimalárica (MESQUITA et al., 2007), também apresenta ação contra promastigotas de *Leishmania donovani*, amastigotas de *Trypanosoma cruzi* (ESPÍNDOLA et al. 2004, MESQUITA et al., 2005), larvas de *Aedes aegypti* (RODRIGUES et al., 2006) e ação antimicrobiana contra os fungos: *Aspergillus niger*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *C. tropicalis* e as bactérias: *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella enteritidis* (FERREIRA et al., 2011).

Tabela 3. Atividade Anti-*P. falciparum* (cepa W2) de extratos e frações de plantas amazônicas.

Família	Espécie	Amostra	Atividade antiplasmodica (µg/mL)	
			W2	FcB1
Annonaceae	<i>Xylopia aromática</i>	Fração (hexano)	—	4,7 ***
		Cerne da Raiz	—	6,8 ***
	<i>Xylopia aromática</i>	Fração (hexano)	—	15,3 **
		Entrecasca	—	4,9 ***
	<i>Aspidosperma macrocarpon</i>	Extrato (etanol) Casca da Raiz	—	—
Apocynaceae	<i>Aspidosperma oblongum</i>	Extrato (etanol)	4,7 ***	—
		Entrecasca	6,0 ***	—
	<i>Aspidosperma spruceanum</i>	Extrato (diclorometano)	19,7 **	—
		Caule	19,7 **	—
	<i>Aspidosperma rigidum</i>	Extrato (diclorometano)	32,8 **	—
		Caule	36,5 **	—
	<i>Aspidosperma ramiflorum</i>	Extrato (etanol)	44,0 **	—
		Caule	65,0 **	—
	<i>Aspidosperma parvifolium</i>	Extrato (etanol)	—	—
		Entrecasca	—	—
<i>Aspidosperma rigidum</i>	Extrato (etanol)	—	—	
	Caule	—	—	
<i>Aspidosperma cylindrocarpon</i>	Extrato (etanol)	—	—	
	Cerne	—	—	
<i>Aspidosperma spruceanum</i>	Extrato (etanol)	—	—	
	Caule	—	—	
Bignoniaceae	<i>Anemopaegma arvense</i>	Fração (hexano)	—	16,1 **
		Raiz	—	24,3 **
	<i>Cybistax antisiphilitica</i>	Fração (hexano)	—	26,5 **
		Cerne	—	27,6 **
Celastraceae	<i>Maytenus guyanensis</i>	Fração (acetato de etila)	56,6 **	—
		Entrecasca	—	—
Rutaceae	<i>Esenbeckia febrifuga</i>	Extrato (etanol) Caule	15,5 **	—
Salicaceae	<i>Casearia sylvestris</i>	Fração (hexano)	—	0,9 ***
		Cerne	—	1,0 ***
	<i>Casearia sylvestris</i>	Fração (hexano)	—	1,2 ***
		Entrecasca	—	1,3 ***
	<i>Casearia sylvestris</i>	Fração (hexano)	—	2,3 ***
		Casca da Raiz	—	7,7 ***
	<i>Casearia sylvestris</i>	Fração (hexano)	—	—
Folha		—	—	
Verbenaceae	<i>Lantana cujabensis</i>	Extrato (etanol)	14,7 **	—
		Folha e Caule	—	—

IC₅₀: Concentração inibitória de 50% da população em teste: IC₅₀ atividade baixa *(IC₅₀>100); IC₅₀ atividade moderada ***(10<IC₅₀>100); IC₅₀ atividade alta (IC₅₀≤10). Fonte: (CABRAL et al., 1993; SANAIOTTI et al., 1997; MIRANDA, 2000; MIRANDA; ABSY, 2000; OKUNADE; LEWIS, 2004; CARVALHO, 2007; DOLABELA, 2007; MESQUITA et al., 2007; DOLABELA et al., 2008; MARIATH et al., 2009; OLIVEIRA, 2012; DE PAULA, 2014; MENEGUETTI et al., 2014a).

Além das cepas W2 e FcB1, também são utilizadas outras (CRC) como: D2, Dd2, K1, FcM29 e Nigerian Strains, em estudos *in vitro* contra *P. falciparum*. Os resultados de extratos e frações de plantas amazônicas contra essas cepas estão representados na Tabela 4.

Tabela 4. Atividade Anti-*P. falciparum* contra as cepas: D2, Dd2, K1 e Nigerian Strains de extratos e frações de plantas amazônicas.

Família	Espécie	Amostra	Atividade antiplasmodica (µg/mL)			
			D2	Dd2	K1	Nigerian Strains
Apocynaceae	<i>Aspidosperma megalocarpon</i>	Extrato (metanol)	8,0			
		Entrecasca	***	—	—	—
	<i>Aspidosperma ulei</i>	Extrato (etanol)	—	—	17,6	—
		Entrecasca			**	
	<i>Aspidosperma megalocarpon</i>	Extrato (metanol)				57,3
		Entrecasca	—	—	—	**
Araceae	<i>Montrichardia linifera</i>	Fração (diclorometano)	—	<10	—	—
		Caule		***		
	<i>Montrichardia linifera</i>	Fração (metanol)	—	<10	—	—
		Caule		***		
	<i>Montrichardia linifera</i>	Extrato (etanol)	—	10<IC ₅₀ <100	—	—
		Caule		**		
	<i>Montrichardia linifera</i>	Fração (acet. etila)	—	10<IC ₅₀ <100	—	—
		Caule		**		
	<i>Montrichardia linifera</i>	Extrato (hexano)	—	>100,0	—	—
		Caule				
	<i>Montrichardia linifera</i>	Fração (hexano)	—	>100,0	—	—
		Caule				

IC₅₀: Concentração inibitória de 50% da população em teste: IC₅₀ atividade baixa *(IC₅₀>100); IC₅₀ atividade moderada **(10<IC₅₀>100); IC₅₀ atividade alta (IC₅₀≤10). Fonte: (CABRAL et al., 1993; MITAINE et al., 1998; WENIGER et al., 2001; MITAINE-OFFER et al., 2002; AMARANTE et al., 2011; DE PAULA, 2014).

As espécies que demonstraram ação antiplasmodial alta foram: *A. megalocarpon* e *M. linifera* e ambas tiveram alguns metabólitos secundários testados, conforme descrito e discutido no tópico seguinte. As folhas de *M. linifera* apresentam alcaloides e triterpenos, o que é sugerido como responsável pela atividade antiplasmodica (BASCO et al., 1994; COSTA et al., 2009a).

3.2.2 Atividade Anti-*P. falciparum* de metabólitos secundários

É importante ressaltar que os dados acima tanto de (CSC) como de (CRC), foram obtidos de extratos e frações, e teoricamente esses resultados podem ser potencializados com o isolamento dos metabólitos secundários dessas plantas. Alguns grupos de pesquisa estão direcionando esforços para o isolamento dessas substâncias com objetivo de obter uma droga

com ação potencializada e menor probabilidade de interações cruzadas e efeitos tóxicos. Em contrapartida existem algumas dificuldades em se trabalhar com esses metabólitos, tanto na obtenção que muitas vezes a quantidade é insuficiente para a realização de testes *in vivo*, como na realização de testes *in vitro*, devido a difícil solubilidade desses compostos, que muitas vezes só ocorre totalmente com solventes altamente tóxicos aos meios de cultura.

Alguns resultados obtidos com metabólitos secundários isolados de plantas da Amazônia brasileira estão exibidos na Tabela 5 e Figura 11.

Os resultados mais promissores foram dos metabólitos neosergeolide, aspidocarpine, elipticina, simalikalactone D e orinocinolide, isolados das espécies: *Picrolemma sprucei*, *Aspidosperma desmanthum*, *Aspidosperma vargasii*, *Quassia amara* e *Simaba orinocensis* respectivamente, ambas com ação contra (CRC).

Os metabólitos neosergeolide, simalikalactone D e orinocinolide fazem parte do grupo dos triterpenos quassinóides que constituem uma classe de substâncias encontradas quase que exclusivamente em plantas da família Simaroubaceae (ALMEIDA et al., 2007).

Os quassinóides quimicamente são considerados triterpenos biodegradados com alto padrão de oxigenação, apresentando uma ampla faixa de atividade biológica (POLONSKY; FORTSCHR, 1985), como: antivirais (APERS et al., 2002), anti-helmíntico (NUNOMURA et al., 2006) e antimalárica (ANDRADE-NETO, 2007), sendo esses metabólitos conhecidos por inibir o crescimento de *P. falciparum in vitro* em concentrações nanomolares, tendo o IC₅₀ até três vezes menor do que o da cloroquina e do quinino na inibição de *P. falciparum* e de até cinco vezes melhor para inibição de *P. berghei*, também demonstrando melhor atividade *in vivo* (roedores), do que a cloroquina e artemisinina, entretanto, geralmente apresentam toxicidade devido principalmente a inibição da síntese de proteínas (FANDEUR et al., 1985; KUO et al. 2004; MUHAMMAD et al., 2004; ANDRADE-NETO, 2007; SILVA ET AL., 2009).

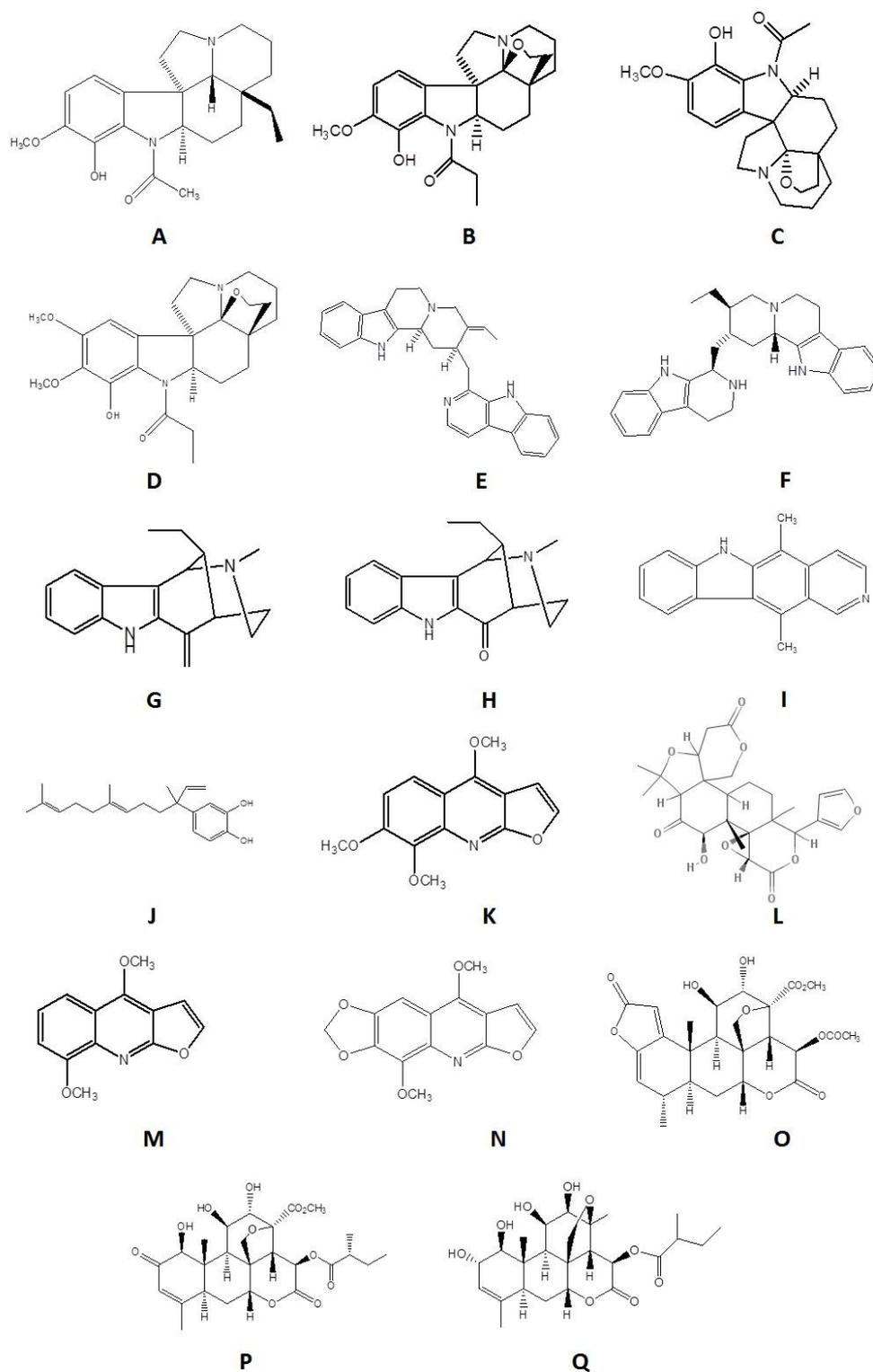
Os outros dois metabólitos que tiveram IC₅₀<0,1µg/mL foram os alcaloides aspidocarpine e elipticina. Os metabólitos aspidocarpine e elipticina, são alcaloides indólicos, com amplo espectro de atividades biológicas além da ação antiplasmódial, como atividade antimicrobiana, antibacteriana e citotóxica, sendo esta última a responsável pela elipticina se tornar um dos alcaloides indólicos mais estudados, chegando a ser utilizada em ensaios clínicos no tratamento do câncer (MITAINE et al., 1998; PEDERSEN et al., 2005; ENDRESS et al., 2007).

Tabela 5. Atividade Anti-*P. falciparum* contra cepas: 3D7, FcM29, K1, W2 e Nigerian Strains, de compostos secundários isolados de plantas amazônicas.

Família	Espécie	Amostra	Atividade antiplasmódica (µg/mL)				Nigerian Strains
			3D7	FcM29	K1	W2	
Simaroubaceae	<i>Picrolemma sprucei</i>	Neosergeolide	—	—	0,001 ***		
Apocynaceae	<i>Aspidosperma desmanthum</i>	Aspidocarpine	—	—	0,007 ***		
	<i>Aspidosperma vargasii</i>	Elipticina	—	—		0,018 ***	
Simaroubaceae	<i>Quassia amara</i>	Simalikalactone D	—	—		0,037 ***	
	<i>Simaba orinocensis</i>	Orinocinolide	—	—		0,085 ***	
Piperaceae	<i>Montrichardia linifera</i>	4-Nerolidylcatechol	—	—	0,21 ***		
	<i>Aspidosperma oblongum</i>	Usambare	—	0,23 ***			
	<i>Aspidosperma oblongum</i>	Ochrolifuani	—	0,47 ***			
	<i>Aspidosperma parvifolium</i>	Uleine	—	—		0,75 ***	
	<i>Aspidosperma ulei</i>	20-epi-dasycarpidone	—	—		4,5 ***	
Apocynaceae	<i>Aspidosperma parvifolium</i>	Uleine	11,9 **	—	—		
	<i>Aspidosperma megalocarpon</i>	Fendlerine	—	25,6 **	—		
	<i>Aspidosperma megalocarpon</i>	Aspidolimidine	—	—	—	28,0 **	
	<i>Aspidosperma megalocarpon</i>	Aspidoalbina	—	59,2 **	—		
Rutaceae	<i>Esenbeckia febrifuga</i>	Skimmiamine	—	—	—	75,3 **	
	<i>Esenbeckia febrifuga</i>	Rutaevine	—	—	—	>100,0 *	
	<i>Esenbeckia febrifuga</i>	Rutaevine	>100,0 *	—	—		
	<i>Esenbeckia febrifuga</i>	g-Fagarine	109,8 *	—	—		
	<i>Esenbeckia febrifuga</i>	g-Fagarine	—	—	—	157,2 *	
	<i>Esenbeckia febrifuga</i>	Skimmiamine	166,0 *	—	—		
	<i>Esenbeckia febrifuga</i>	Flindersiamine	265,6 *	—	—		
	<i>Esenbeckia febrifuga</i>	Flindersiamine	—	—	—	348,0 *	

IC₅₀: Concentração inibitória de 50% da população em teste: IC₅₀ atividade baixa *(IC₅₀>100); IC₅₀ atividade moderada **(10<IC₅₀>100); IC₅₀ atividade alta (IC₅₀≤10). Fonte: (AMORIM et al., 1986; AMORIM et al., 1988; MITAINE et al., 1998; MITAINE-OFFER et al., 2002; MUHAMMAD et al., 2004; DOLABELA, 2007; ALMEIDA et al., 2007; BERTANIA et al., 2006; ANDRADE-NETO, 2007; DOLABELA et al., 2008; CALDERON et al., 2009; PASSEMAR et al., 2011; DE PAULA, 2014; CHIERRITO et al., 2014)

Figura 11. Estrutura química de compostos secundários isolados de plantas da Amazônia com atividade anti-*P. falciparum*.



A: Aspidocarpine; B: Fendlerine; C: Aspidolimidine; D: Aspidoalbine; E: Usambarensin; F: Ochrolifuanin A; G: Uleine; H: 20-epi-dasycarpidone; I: Ellipticine; J: 4-Nerolidylcatechol; L: Rutaevine; M: g-Fagarine; N: Flindersiamine; O: Neosergeolide; P: Simalikalactone D; Q: Orinocinolide.

As espécies *M. linifera* e *A. oblongum*, tiveram seus resultados potencializados com o isolamento dos metabólitos 4-nerolidylcatechol, usambare e ochrolifuni, onde os melhores resultados dos extratos e frações foram entre IC₅₀ de 4,0 a 10µg/mL, enquanto nos isolados o IC₅₀ foi de 0,21 a 0,47µg/mL, ambos testados contra (CRC), mostrando a importância do isolamento dessas substâncias, para a busca de novos fármacos. Por outro lado à espécie *A. megalocarpon*, teve sua ação reduzida com o isolamento dos metabolitos fendlerine, aspidolimidine e aspidoalbina, pois enquanto o extrato metanólico apresentou IC₅₀=8,0µg/mL, os isolados tiveram apenas o IC₅₀ entre 25,6 e 59,2µg/mL ambos testados contra (CRC), demonstrando que nessa espécie a boa atividade do extrato pode estar relacionada à interação entre os diferentes alcaloides, ou o metabólito com a principal ação antiplasmodial, ainda não foi isolado e/ou testado.

Além das espécies com dados comprobatórios de ação Anti-*plasmodium falciparum*, outras também são citadas pelas populações tradicionais no tratamento antimalárico, antifebril, antiparasitária e dores no fígado, tais como: Apocynaceae: *A. album*, *A. auriculatum*, *A. cuspa*, *A. discolor*, *A. sandwithianum*, *A. schultesii*, *A. tomentosum*; Apocynaceae: *Himatanthus sucuuba*; Asteraceae: *Ageratum conyzoides*; Bixaceae: *Bixa orellana*; Clusiaceae: *Mammea americana*; Compositae: *Acanthospermum australe*, *Pluchea sagittalis*, *Spilantes oleracea*, *Vernonia condensata*; Convolvulaceae: *Calycobolus* sp; Euphorbiaceae: *Croton cajucara*, *C. lechleri* *Euphorbia papillosa*; Fabaceae: *Bowdichia* sp, *Erythrina* sp, *Senna occidentalis*, *S. alata*, *S. spruceana*; Guttiferae: *Vismia japurensis*; Labiatae: *Leonotis nepetaefolia*, *Ocimum* sp; Leguminosae: *Bauhinia rutilans*, *Desmodium aakendens*; Malpighiaceae: *Banisteriopsis caapi*, Malvaceae: *Gossypium herbaceum*, *Sida spinosa*; Meliaceae: *Carapa guianensis*; Menispermaceae: *Abuta concolo*, *A. grandifolia*; Moraceae: *Ficus* sp; Nyctaginaceae: *Boerhavia hirsuta*; Piperaceae: *Piper glabratum*, *P. acutifolium*, *P. callosum*; Poycynaceae: *Geissospermum sericeum*; Portulacaceae: *Portulaca pilosa*; Rhamnaceae: *Ampelozizyphus amazonicus*; Rubiaceae: *Coutarea hexandra*, *Cinchona* sp, *Remijia* sp, *Psychotria viridis*; Solanaceae: *Physajis brasiliensis*, essas espécies são indicadas para estudos da ação antiplasmodial de seus extratos, frações e isolados (DI STASI, 2002; LEE; COLL, 2002; ANDRADE-NET et al., 2003; BARBOSA et al., 2003; QUIGNARD et al., 2003; BERG, 2010; ARAÚJO JR et al., 2007; FLORES et al., 2008; CALDERON et al., 2009; FÃO et al., 2012; BEZERRA et al., 2012).

3.3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Constatou-se uma grande diversidade de espécies vegetais na Amazônia brasileira com potencial para a investigação de novos fitoterápicos e metabólitos secundários com ação antiplasmodial, além do tratamento de outras parasitoses negligenciadas. A presente revisão demonstrou que estudos futuros devem ser direcionados com espécies que apresentem os metabólitos triterpenos quassinóides e alcaloides indólicos, estes que apresentaram as melhores ações anti-*P. falciparum*. Porém, para a realização desses estudos é necessário além de apoio financeiro, a interação entre diferentes laboratórios e grupos de pesquisa para a formação de equipes multidisciplinares e interdisciplinares, o que irá potencializar o nível da pesquisa na região e aumentar a probabilidade de descoberta de novos fármacos antimaláricos.

4. CAPÍTULO II

Revisão Bibliográfica: Plantas da Amazônia Brasileira com Potencial Antileishmanial *In Vitro*

Esse capítulo é referente aos dados do artigo de revisão bibliográfica:

Plantas da Amazônia Brasileira com Potencial Antileishmanial *In Vitro*

Submetido à Revista Patologia Tropical



4.1 ETNOFARMACOLOGIA ANTILEISHMANIAL

São descritas 32 espécies de plantas da Amazônia brasileira com atividade antileishmanial, sendo distribuídas em 18 famílias botânicas. Destas, 27 apresentaram ação contra a espécie *Leishmania amazonensis*, 7 contra *Leishmania donovani*, 6 contra *Leishmania braziliensis*, 3 contra *Leishmania chagasi*, 2 contra *Leishmania guyanensis* e 2 contra *Leishmania major*.

4.2 PLANTAS COM ATIVIDADE CONTRA FORMAS PROMASTIGOTAS DE *Leishmania* spp

As formas promastigotas de *Leishmania sp* são flageladas extracelulares, e estão presentes no trato digestório dos insetos vetores (CHOI; LERNER, 2001; SOARES-BEZERRA et al., 2004).

Foram encontradas 27 espécies de plantas amazônicas com atividade contra formas promastigotas de *Leishmania* spp, sendo divididas em 16 famílias, conforme pode ser observado na Tabela 6.

Os extratos com potencial ação contra formas promastigotas foram isolados da espécie *C. sylvestris*, onde os extratos hexânicos do cerne, da casca do caule e o extrato etanólico da casca da raiz, apresentaram respectivamente um IC₅₀ de 0.3 µg/mL, 0.2 µg/mL e 0.1 µg/mL contra *L. donovani* (MESQUITA et al., 2005).

Extratos de *Casearia sylvestris* tem sido utilizados na medicina popular como agentes antiinflamatórios, antiúlcera, antiofídico e antitumoral (FERREIRA et al., 2011), sendo descrito por Mesquita et al. (2005), como um potente leishmanicida e antitrypanosomal.

Tabela 6. Atividade antileishmanial em células promastigotas de *Leishmanial* spp.

Familia	Espécie	Amostra	Atividade antileishmanial		
			IC ₅₀	Espécie	Referências
Annonaceae	<i>Ammona foetida</i>	Extrato hexânico (casca)	42.7 µg/mL**	<i>L. guyanensis</i>	COSTA et al., 2006
		Extrato diclorometânico (casca)	2.7 µg/mL***	<i>L. guyanensis</i>	
		Extrato metanólico (casca)	23 µg/mL**	<i>L. braziliensis</i>	
			9.1 µg/mL***	<i>L. guyanensis</i>	
			24.3 µg/mL**	<i>L. braziliensis</i>	
			10.7 µg/mL**	<i>L. braziliensis</i>	
		Liriodenine	18 µg/mL**	<i>L. braziliensis</i>	COSTA et al., 2009b
		Óleo essencial (Folhas)	16.2 µg/mL**	<i>L. amazonensis</i>	
			9.9 µg/mL*	<i>L. braziliensis</i>	
			27.2 µg/mL**	<i>L. chagasi</i>	
			4.1 µg/mL*	<i>L. guyanensis</i>	
			25 µg/mL [#]	<i>L. amazonensis</i>	
	<i>Ammona spinescens</i>	Anonaine (raiz)	50 µg/mL [#]	<i>L. braziliensis</i>	MAHIOU et al., 1994 CALDERON et al., 2009
			100 µg/mL [#]	<i>L. donovani</i>	
			30.8 µg/mL [#]	<i>L. amazonensis</i>	
	<i>Guatteria foliosa</i>	Isoguattouregidine (entrecasca)	30.8 µg/mL [#]	<i>L. donovani</i>	MAHIOU et al., 1994 ZASLOFF, 2002 CALDERON et al., 2009
Apocynaceae	<i>Himatanthus obovatus</i>	Extrato etanólico (raiz)	7.5 µg/mL***	<i>L. donovani</i>	MESQUITA et al., 2005
Araliaceae	<i>Hydrocotyle bonariensis</i>	Extrato metanólico (folhas)	235 µg/mL*	<i>L. chagasi</i>	TEMPONE et al., 2008
			302.5 µg/mL*	<i>L. amazonensis</i>	
Aristolochiaceae	<i>Aristolochia cymbifera</i>	Extrato metanólico (folhas)	89.2 µg/mL**	<i>L. chagasi</i>	
Cecropiaceae	<i>Cecropia pachystachya</i>	Fração acetato de etila (folhas)	53.3 µg/mL**	<i>L. amazonensis</i>	CRUZ et al., 2013
		Fração n-butanol (folhas)	24.8 µg/mL**	<i>L. amazonensis</i>	
		Fração diclorometano (folhas)	5.6 µg/mL***	<i>L. amazonensis</i>	
Clusiaceae	<i>Garcinia brasiliensis</i>	Extrato hexânico (frutos)	15 µg/mL**	<i>L. amazonensis</i>	PEREIRA et al., 2011
		Fukugetin (frutos)	3.2 µg/mL***	<i>L. amazonensis</i>	
Combretaceae	<i>Combretum Leprosum</i>	Extrato etanólico (frutos)	24.8 µg/mL**	<i>L. amazonensis</i>	TELES et al., 2011 BARRON et al., 2013
		3β,6β,16β-triidroxilup-20(29)-eno	3.3 µg/mL*	<i>L. amazonensis</i>	
Euphorbiaceae	<i>Croton cajucara</i>	Óleo essencial (folhas)	0.008 µg/mL***	<i>L. amazonensis</i>	ROSA et al., 2003
		linalool (folhas)	0.004 µg/mL***	<i>L. amazonensis</i>	
Fabaceae	<i>Copaifera reticulata</i> <i>Copaifera martii</i> <i>Copaifera paupera</i> <i>Copaifera officinalis</i> <i>Copaifera multijuga</i>	Óleo (seiva)	5 µg/mL***	<i>L. amazonensis</i>	SANTOS et al., 2008
			14 µg/mL**	<i>L. amazonensis</i>	
			11 µg/mL**	<i>L. amazonensis</i>	
			20 µg/mL**	<i>L. amazonensis</i>	
			10 µg/mL***	<i>L. amazonensis</i>	
Lacistemataceae	<i>Lacistema pubescens</i>	Extrato metanólico (folhas)	3.9 µg/mL***	<i>L. amazonensis</i>	SILVA et al., 2014a
			45.6 µg/mL**	<i>L. braziliensis</i>	
		Extrato hexânico (folhas)	3.5 µg/mL***	<i>L. amazonensis</i>	
			17 µg/mL**	<i>L. braziliensis</i>	
Lecythidaceae	<i>Gustavia elliptica</i>	Extrato hexânico (entrecasca)	17 µg/mL**	<i>L. braziliensis</i>	ALMEIDA et al., 2011
		Extrato clorofórmico (entrecasca)	6.4 µg/mL***	<i>L. braziliensis</i>	
		Extrato metanólico (entrecasca)	10 µg/mL***	<i>L. braziliensis</i>	
		Trans-caryophyllene, ethyl palmitate, hidnocarpató de ethyl, Ethyl oleate, ethyl stearate and friedelin together (entrecasca)	197.8 µg/mL*	<i>L. braziliensis</i>	
			290.6 µg/mL*	<i>L. guyanensis</i>	
		Extrato clorofórmico (entrecasca)	7.7 µg/mL***	<i>L. guyanensis</i>	
Meliaceae	<i>Guarea kunthiana</i>	Extrato hexânico (raiz)	7.9 µg/mL***	<i>L. donovani</i>	MESQUITA et al., 2005
Moraceae	<i>Pourouma guianensis</i>	Epi-friedelinol (folhas)	91 µg/mL**	<i>L. amazonensis</i>	TORRES-SANTOS et al., 2004
		Stigmasterol + Sitosterol (folhas)	56 µg/mL**	<i>L. amazonensis</i>	
		Ácido oleonólico (folhas)	10 µg/mL**	<i>L. amazonensis</i>	
		Ácido ursólico (folhas)	5 µg/mL*	<i>L. amazonensis</i>	
		Sitosterol + Stigmasterol glucosides (folhas)	50 µg/mL**	<i>L. amazonensis</i>	
Piperaceae	<i>Piper glabratum</i> and <i>Piper acutifolium</i>	Methyl 3,4-dihydroxy-5-(3'-methyl-2'-butenyl)benzoate (folhas)	13.8 µg/mL**	<i>L. braziliensis</i>	FLORES et al., 2008
			18.5 µg/mL**	<i>L. donovani</i>	
			18.2 µg/mL**	<i>L. amazonensis</i>	
			81.9 µg/mL**	<i>L. braziliensis</i>	
	<i>Piper aduncum</i>	Extrato metanólico (folhas)	81.9 µg/mL**	<i>L. donovani</i>	
			89.5 µg/mL**	<i>L. amazonensis</i>	
			29 µg/mL**	<i>L. amazonensis</i>	
<i>Piper carniconektivum</i>	(2-[1-hydroxy-3-phenyl-(Z,E)-2-propenylidene]-4-methyl-4-cyclopentene-1,3-dione) (raiz)	4.4 µg/mL***	<i>L. amazonensis</i>	PAES-GONÇALVES et al., 2012	
<i>Piper tuberculatum</i>	3-(3,4,5-trimethoxyphenyl) (frutos)	145 µg/mL*	<i>L. amazonensis</i>	FERREIRA et al., 2010	
<i>Pothomorphe umbellata</i>	Extrato metanólico (folhas)	39 µg/mL**	<i>L. amazonensis</i>	BRAGA et al., 2007	
Salicaceae	<i>Casearia sylvestris</i>	Extrato hexânico (folhas)	3.7 µg/mL***	<i>L. donovani</i>	MESQUITA et al., 2005
		Extrato hexânico (cerne)	0.2 µg/mL***	<i>L. donovani</i>	
		Extrato hexânico (cerne)	0.3 µg/mL***	<i>L. donovani</i>	
		Extrato etanólico (casca da raiz)	0.1 µg/mL***	<i>L. donovani</i>	
		Extrato (casca da raiz)	1.0 µg/mL***	<i>L. donovani</i>	
		Extrato etanólico (raiz)	5 µg/mL***	<i>L. donovani</i>	
		Extrato hexânico (raiz)	11.4 µg/mL**	<i>L. donovani</i>	
		Extrato etanólico (frutos)	4.9 µg/mL***	<i>L. donovani</i>	
		Extrato hexânico (frutos)	9.5 µg/mL***	<i>L. donovani</i>	
Verbenaceae	<i>Lippia alba</i>	Extrato metanólico (folhas)	62.7 µg/mL**	<i>L. chagasi</i>	TEMPONE et al., 2008

IC₅₀: Concentração inibitória de 50% da população em teste: baixa atividade *(IC₅₀>100); atividade moderada ***(10<IC₅₀>100); alta atividade *** (IC₅₀≤10). # Concentração inibitória de 100% da população em teste.

A composição química de *C. sylvestris* é caracterizada principalmente por diterpenos tipo clerodânicos (BOU et al., 2014), entre eles casearvestrina A, casearvestrina B, casearvestrina C (OBERLIES et al., 2002) 15-hidroxi-3-cleroden-2-one, ácido (-)-hardwickiic (SANTOS et al., 2007), casearina A, casearina B, casearina G, casearina J (SANTOS et al., 2007; BOU et al., 2014), casearina U, casearina V, 2 β -metoxi-cleroda-3,13-dien-18-carboxi-15,16-olideo, 15 ξ -metoxi-cleroda-3,12-dien-18-carboxi-15,16-olideo, 15-oxo-echinophyllina A, echinophyllina A, ácido (-)-patagonico, tyrosol, oplopanona, 4-hidroxi-4-metil-2-[(1R)-1-(1-metiletil)-4-oxopentil]-2-ciclohexen-1-ona e 1 β ,6 α -dihidroxiudesman-4(15)-eno (WANGGET al., 2009a), sendo encontrado também diterpenos glicosídeos como sylvestrisides A e B (WANGGET al., 2009b).

Os metabólitos casearinas isolados da *C. sylvestris* tem demonstrado uma boa ação contra *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania* spp (BOU et al., 2014), provavelmente devido a provocarem o rompimento da membrana plasmática do parasito, o que ocasiona o esgotamento dos gradientes iônicos, efluxo de nutrientes e outros componentes citoplasmáticos, provocando a lise osmótica e consequentemente a morte celular (MARR et al., 2012). A segmentação da membrana plasmática de protozoários tem sido considerada uma abordagem promissora para o estudo de novos candidatos a fármacos (OLIVEIRA et al., 2012), porém, alguns casearins, como o casearin J, tem demonstrado uma elevada toxicidade em células de mamíferos (BOU et al., 2014), sendo indicados estudos futuros para uma melhor compreensão desses efeitos, pois a composição de esteroides da família Tripanosomatidae difere das células de mamíferos, devido à presença predominante do ergosterol, episterol, e outros 24 esteróis metílicos, que são completamente ausente nas células dos hospedeiros (MEDINA et al., 2012).

Entre as espécies estudadas contra *L. amazonensis*, os extratos com melhor ação foram os extratos hexânico e metanólico das folhas da espécie *L. pubescens*, com IC₅₀ de 3.5 μ g/mL e 3.9 μ g/mL respectivamente. Estes extratos também demonstram ação contra as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae* e *Enterococcus faecalis* (SILVA et al., 2014a), além de atividade antinociceptiva, antiinflamatória (SILVA et al., 2012) e antioxidante, esta última ocorre provavelmente devido a presença de compostos fenólicos detectados nesta espécie (SILVA et al., 2011), juntamente com ácido palmítico, esteárico e ácido linoleico; phytol e sitosterol (SILVA et al., 2012; SILVA et al., 2014a).

A presença do sitosterol e o phytol podem justificar a ação leishmanicida dessa espécie, visto que em estudo realizado por Torres-Santos et al. (2004) o sitosterol inibiu 70% das formas promastigotas de *L. amazonensis*, demonstrando também atividade antiproliferativa contra células de tumores humanos (CUNHA-FILHO et al., 2010), sugerindo que o sitosterol induz a endorreduplicação, promovendo a dinâmica dos microtúbulos do fuso por meio de vias de sinalização. Enquanto o phytol tem demonstrado indução de apoptose (KOMIYA et al., 1999), provocando citotoxicidade em linhagens celulares de câncer como HL60 (BLOCK et al., 2004).

Contra o agente etiológico *L. braziliensis*, a espécie *G. elliptica* demonstrou os melhores resultados com IC₅₀ de 6,4µg/mL do extrato clorofórmico e 10µg/mL do extrato metanólico, ambos preparados da entrecasca (ALMEIDA et al., 2011). A espécie *G. elliptica* apresenta em sua estrutura química norisoprenoides: blumenol B e 6-epiblumenol B, triterpenos: friedelina, friedelanol, α-amirina, β-amirina, epifriedelanol, moretenol, e urs-9(11), 12-dien-3-ol; sesquiterpenos: trans-cariofileno e α-humuleno; ésteres de ácidos graxos: palmitato de etila, linoleato de etila, oleato de etila, estearato de etila e hidnocarpato de etila (ALMEIDA et al., 2011).

Uma das prováveis explicações para a atividade antileishmanial desta espécie é a presença de triterpenos e sesquiterpenos, visto que suas eficácias antiparasitárias são demonstradas por vários estudos (TORRES-SANTOS et al., 2004; TELES et al., 2011; BEGUM et al., 2014).

Torres-Santos et al. (2004) e Teles et al. (2011) realizaram estudos da ação de triterpenos isolados sobre as formas promastigotas de *L. amazonensis* e descobriram que triterpenos pentacíclicos com maior número de grupos de hidroxilas apresentam maior ação antipromastigotas. Outro estudo demonstra que os triterpenos, estimulam a granulocitose e fagocitose, auxiliando no combate à infecção (AKIHISA et al., 1996). Porém, mesmo com essas informações até o momento o mecanismo de ação pelo qual os triterpenos inibem o crescimento de formas promastigotas de *Leishmania* spp ainda não foi totalmente elucidado (LIMA et al., 2011).

Entre os metabólitos secundários isolados, o que apresentou melhor resultado com IC₅₀ de 0.004 µg/mL foi o linalool isolado das folhas da espécie *C. cajucara*, esta que também apresentou o óleo essencial com IC₅₀ 0.008 µg/mL, ambos tiveram ação contra células promastigotas da espécie *L. amazonensis* (ROSA et al., 2003).

Um dos mecanismos de ação do linalool, estimula a produção de espécies reativas de oxigênio como o óxido nítrico (NO), para inibir a atividade da cadeia respiratória mitocondrial e para diminuir os níveis de adenosina trifosfato (ATP) e glutatona das células (USTA et al., 2009; RONDON et al., 2012), o que provoca a sua ação antileishmania.

O linalool também apresenta ação antitripanossomicida contra células epimastigotas e tripomastigota de *T. cruzi* (SANTORO et al., 2007), antibacteriana cariogênicas e periodontopatogênicas (PARK et al., 2012), atuando contra as espécies *S. aureu*, *E. faecalis*, *E. coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella typhi* e *P. aeruginosa* (MAZZANTI et al., 1998). Estudo realizado com as bactérias *S. aureus*, *E. coli* e *S. typhimurium*, descreve outro mecanismos de ação do linalool, onde o mesmo provoca alteração da permeabilidade e na função da membrana plasmática, provocando a perda da matéria intracelular e consequentemente a morte celular (ZENGIN; BAYSAL, 2014). Outra atividade descrita para o linalool é a ação contra os fungos *Candida albicans*, *Candida krusei* e *Candida Tropicalis* (MAZZANTI et al., 1998), do mesmo modo esta ação antifungica foi observada em óleos essenciais que contém linalool, contra as espécies *Pythium ultimum*, *Sclerotium rolfsii*, *Phytophthora capsici* e *Septoria tritici* (ANGIONI et al., 2003). Os óleos essenciais contendo linalool em sua composição química também apresentam ação *in vitro* contra células epimastigota e tripomastigota de *T. cruzi* (SANTORO et al., 2007).

Outros metabólitos que apresentaram bons resultados contra promastigotas foram fukugetin isolado da espécie *G. brasiliensis* e $3\beta,6\beta,16\beta$ -triidroxilup-20(29)-eno isolado de *C. leprosum* com IC₅₀ de 3,2 µg/mL e 3,3 µg/mL respectivamente, ambos contra *L. amazonensis* (PEREIRA et al., 2011; TELES et al., 2011).

O metabólito $3\beta,6\beta,16\beta$ -triidroxilup-20(29)-eno, também apresentou atividade antinociceptiva (PIETROVSKI et al., 2006), microbiológica (LIMA et al., 2011) e com o mesmo foi desenvolvida uma formulação lipossomal que reduziu a taxa de infecção de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c por promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* (BARROS et al., 2013). Uma das prováveis explicações para a ação leishmanicida desse metabólito é a desestabilização da membrana plasmática (BRONIATOWSKI et al., 2012).

4.3 PLANTAS COM ATIVIDADE CONTRA CÉLULAS AMASTIGOTAS INTRACELULAR DE *Leishmania* spp

Foram encontradas 9 espécies de plantas amazônicas com atividade antileishmanial contra células amastigotas intracelular, sendo divididas em 7 famílias, conforme pode ser observado na Tabela 7.

Tabela 7. Atividade antileishmanial em amastigotas intracelular de *Leishmania* spp.

Familia	Espécie	Amostra	Atividade antileishmanial		
			IC ₅₀	Espécies	Referências
Apocynaceae	<i>Himatanthus sucuuba</i>	latex (Caule)	15.7 µg/mL**	<i>L. amazonensis</i>	SEM; CHATTERJEE et al., 2011 SOARES et al., 2010
	<i>Bidens pilosa</i>	Extrato hidroalcoólico (Folhas)	42.6 µg/mL**	<i>L. amazonensis</i>	SEM; CHATTERJEE et al., 2011 GARCÍA et al., 2010
Euphorbiaceae	<i>Croton pullei</i>	Julocrotine (Casca)	6.1 µg/mL***	<i>L. amazonensis</i>	GUIMARÃES et al., 2010
	<i>Croton cajucara</i>	Óleo essencial (Folhas)	0.02 µg/mL***	<i>L. amazonensis</i>	ROSA et al., 2003
		Linalool (Folhas)	0.01 µg/mL***	<i>L. amazonensis</i>	
Fabaceae	<i>Copaifera reticulata</i>	Óleo (seiva)	20 µg/mL [#]	<i>L. amazonensis</i>	SANTOS et al., 2008
Lacistemataceae	<i>Lacistema pubescens</i>	Extrato metanólico (Folhas)	35.9 µg/mL**	<i>L. amazonensis</i>	SILVA et al., 2014a
		Extrato hexânico (Folhas)	22.1 µg/mL**	<i>L. amazonensis</i>	
Moraceae	<i>Pourouma guianensis</i>	2α,3β-dihydroxyursan-12-en-28-oic acid (Folhas)	27 µg/mL**	<i>L. amazonensis</i>	TORRES-SANTOS et al., 2004 SEM; CHATTERJEE et al., 2011 BARROS et al., 2013
		Plumbagin (Casca)	10 µg/mL ^{##}	<i>L. amazonensis</i>	FOURNET et al., 1992a FOURNET et al., 1992b
		3,3-Biplumbagin (Casca)	50 µg/mL ^{##}	<i>L. amazonensis</i>	
Peraceae	<i>Pera benensis</i>	8,8-Biplumbagin (Casca)	10 µg/mL***	<i>L. amazonensis</i>	FOURNET et al., 1992b
		Glucantime (Casca)	10 µg/mL ^{##}	<i>L. amazonensis</i>	
		Fisalina B (folhas)	0.06 µg/mL***	<i>L. amazonensis</i>	
Solanaceae	<i>Physalis angulata</i>	Fisalina F (folhas)	0.05 µg/mL***	<i>L. major</i>	GUIMARÃES et al., 2009

IC₅₀: Concentração inibitória de 50% da população em teste: baixa atividade *(IC₅₀>100); atividade moderada ** (10<IC₅₀>100); alta atividade *** (IC₅₀≤10). [#] Concentração inibitória de 100% da população em teste. ^{##} Concentração inibitória de 80% a 90% da população em teste.

Os extratos que apresentaram melhores resultados contra células amastigotas intracelular de *L. amazonensis* foram os hexânico e metanólico das folhas de *L. pubescens* com IC₅₀ de 22.1 µg/mL e 35.9 µg/mL respectivamente, resultados estes superiores aos obtidos em células promastigotas onde os mesmos extratos apresentaram IC₅₀ abaixo de 4,0 µg/mL (SILVA et al., 2014a). Esses extratos também demonstraram citotoxicidade para células do hospedeiro, porém, aproximadamente quatro vezes menores que as apresentadas pelas células amastigotas de *L. amazonensis* (SILVA et al., 2014a), demonstrando a importância da realização de estudos futuros para o isolamento dos metabólitos secundários que revertam a citotoxicidade e potencializem os efeitos antileishmania.

Assim como nos dados com as formas promastigotas, a espécie *C. cajucara* foi responsável pelo melhor resultado com metabólito secundário isolado testado contra as amastigotas de *L. amazonensis*, onde o linalool retirado das folhas demonstrou um IC₅₀ de 0.01 µg/mL, mantendo um perfil similar ao observado com o óleo essencial também extraído das folhas com IC₅₀ de 0.02 µg/mL (ROSA et al., 2003).

Um estudo realizado por Rosa et al. (2003) demonstrou que células tratadas com linalool produziram o dobro da quantidade de NO em relação ao controle negativo, o que reforça a hipótese de que o mesmo atua estimulando a produção de NO por macrófagos, provocando a erradicação da infecção por *Leishmania* spp. Além disso, o linalool não apresentou citotoxicidade contra as linhagens de células de carcinoma cervical humano (HeLa), carcinoma de pulmão humano (A-549), adenocarcinoma do cólon humano (HT-29), células do rim de primatas (Vero) (SILVA et al., 2007) e macrófagos peritoneais de camundongos (SILVA et al., 2007; ROSA et al., 2003), demonstrando a inocuidade citotóxica contra células de mamíferos (ROSA et al., 2003) e um grande potencial farmacológico.

Os metabólitos fisalinas F e B isolados das folhas de *P. angulata*, também apresentaram resultados promissores com IC₅₀ de 0.05 µg/mL contra *L. major* e IC₅₀ de 0.06 µg/mL contra *L. amazonensis* respectivamente (GUIMARÃES et al., 2009).

A atividade *in vivo* da fisalina F foi demonstrada em um modelo de leishmaniose cutânea em camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis*. Estes resultados sugerem a utilização de fisalina como uma droga alternativa no tratamento da leishmaniose cutânea (GUIMARÃES et al., 2010).

Fisalinas B e F tem atividade anti-inflamatória e imunomoduladora (SOARES et al., 2003; SOARES et al., 2006), inibindo a produção de NO e citocinas pró-inflamatórias tais como interleucina-12 (IL-12), fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e fator nuclear kappa B (NF- κ B) (SOARES et al., 2003; JACOBO-HERRERA et al., 2006). A IL-12 estimula a produção de interferon- γ (IFN- γ) pelos linfócitos T e pelas células (NK), estas que, por sua vez, ativam os macrófagos para destruir os parasitos de *Leishmania* spp (SEDER et al., 1993). O TNF- α também ativa os macrófagos para eliminar as formas intracelulares do parasito por meio de um mecanismo que envolve a produção de NO (BOGDAN et al., 1990). O NF- κ B é um fator de transcrição importante nas respostas inflamatórias, e acredita-se que sua inibição ocorre devido a presença de uma ligação dupla e um anel epóxido entre os carbonos 5 e 6 das fisalinas B e F respectivamente (JACOBO-HERRERA et al., 2006; GUIMARÃES et al., 2009). Apesar do efeito benéfico do tratamento fisalinas *in vivo* parecer contraditório devido sua atividade inibitória promissora e ao mesmo tempo ação imunossupressora, acredita-se que a inibição de crescimento de *Leishmania in vivo*, ocorreu devido à ação direta destes *seco*-esteroides no parasito, estes que também apresentam propriedades anti-inflamatórias que podem ser relevantes para o processo de cicatrização das lesões cutâneas de leishmaniose, sugerindo que os dois mecanismos de ação das fisalinas,

imunomodulador e leishmanicida, desempenham um papel no tratamento da leishmaniose cutânea (GUIMARÃES et al., 2009).

As fisalinas B e F inibem o crescimento de vários tipos de células de leucemia humana *in vitro*, tendo fisalina F demonstrado citotoxicidade *in vitro* em linhagens celulares de câncer humano (WU, 2012), indicando que fisalina F podem atuar potencialmente como um quimiopreventivo ou agente quimioterapêutico, desencadeando mecanismos de apoptose que ocorre pela fragmentação do DNA e externalização de fosfatidilserina (OOI, 2013). Não foram encontrados estudos que demonstrem a citotoxicidade das fisalinas B e F sobre macrófagos de mamíferos, sendo indicados estudos para avaliação dos riscos genotóxicos *in vivo*.

Também é importante destacar que os resultados antileishmanicidas podem variar de acordo com a técnica utilizada, o tempo de exposição à droga, variação geográfica da espécie vegetal e também o período de coleta da mesma, sendo indicados estudos futuros analisando também essas características.

4.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Constatou-se uma grande diversidade de espécies vegetais da Amazônia brasileira como potencial fonte de compostos para a investigação de novos fitoterápicos e metabólitos secundários com ação antileishmanial. A presente revisão demonstrou que as espécies dos gêneros *Casearia*, *Croton* e *Physalis* são fortes candidatas para busca de novos fármacos antileishmanicidas, pois ambas apresentaram um IC₅₀ menor que 1µg/mL em testes *in vitro* contra as formas promastigotas ou amastigotas de *Leishmania* spp. Sendo também indicado o direcionamento de estudos futuros para espécies que apresentem metabólitos terpenóides ou esteroides, visto o potencial antileishmanial que os mesmos demonstram. Porém, para a realização desses estudos é necessários além de apoio financeiro, a interação entre diferentes laboratórios e grupos de pesquisa para a formação de equipes multidisciplinares e interdisciplinares, o que irá potencializar o nível da pesquisa na região e maximizar a probabilidade de descoberta de novos fármacos antiparasitários.

5. CAPÍTULO III

Análise Citotóxica, Mutagênica e Genotóxica do Extrato Aquoso de *Maytenus guianensis* Klotzsch Ex Rissek (Celastraceae) Chichuá (Xixuá) Amazônico

Esse capítulo é referente aos dados dos artigos:

**Análise Citotóxica e Mutagênica do Extrato Aquoso de *Maytenus guianensis* Klotzsch Ex
Rissek (Celastraceae) Chichuá (Xixuá) Amazônico**

Publicado na Revista Ciência e Natura (Anexo II)

CIÊNCIA^e NATURA

e

**Acute genotoxicity analysis *in vivo* of the aqueous extract of *Maytenus guianensis*
amazonian chichuá**

Publicado na Revista Brasileira de Farmacognosia (Anexo III)



5.1 MATERIAL E MÉTODOS

5.1.1 Coleta e identificação do material vegetal

As amostras de *M. guianensis* foram coletadas em fevereiro de 2008 na Reserva Florestal Adolpho Ducke, localizada no Km 26 da Estrada Manaus-Itacoatiara (AM-010) (Latitude 02°53'S, Longitude 59°58'W). A identificação da espécie foi realizada no Herbário do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA), exsicata nº 188.485.

5.1.2 Preparo do extrato

A entrecasca *M. guianensis* foi triturada para aumentar a superfície de contato com o solvente, os extratos aquosos foram preparados por meio de maceração em H₂O mineral por 72 horas para os testes de *Allium cepa* e infusão em H₂O mineral a 80°C por 10 minutos, para os testes em camundongos. Ambos nas seguintes concentrações: (3,85mg/mL) normalmente utilizada pela população em macerações e infusões, (38,5mg/mL) dez vezes mais concentrada, (77mg/mL) vinte vezes mais concentrada e (192mg/mL) cinquenta vezes mais concentrada (CAMPAROTO et al., 2002).

5.1.3 Análise citotóxica e mutagênica em *A. cepa*

O experimento utilizou a espécie *Allium cepa*, (conhecida popularmente como cebola de cabeça) orgânica de tamanho uniforme, de mesma origem, não germinadas e saudáveis.

Em cada concentração e controles foram utilizadas 10 bulbos e *A. cepa*, sendo estes submersos para germinação em 50mL dos extratos em estudo a 24C°, durante 72 horas.

Foram utilizados os seguintes tratamentos: Controle Negativo (CN) contendo H₂O mineral e Controle Positivo (CP) contendo paracetamol diluído na concentração de 800mg/L, esta que é descrita como citotóxica e mutagênica (BESSEMS et al., 1995; STURBELLE et al., 2008; DÜSMAN et al., 2012). Para os testes citotóxicos e mutagênicos foi utilizado o CN e o extrato aquoso de *M. guianensis* nas seguintes concentrações: 3,85mg/mL, 38,5mg/mL,

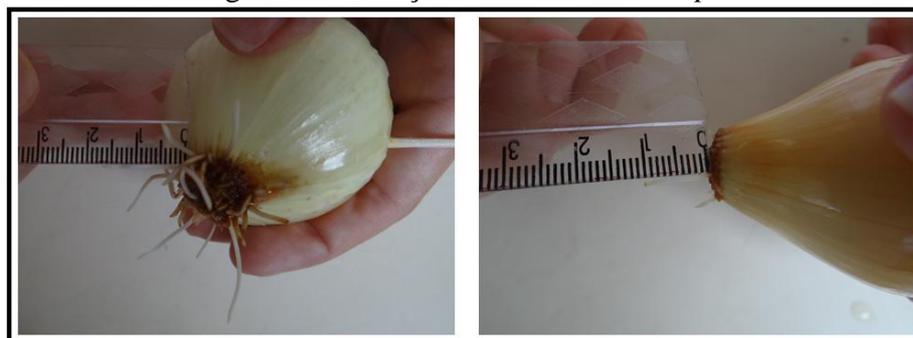
77mg/mL e 192mg/mL. Já para os testes anticitotóxicos e antimutagênicos foram utilizadas as mesmas concentrações do extrato aquoso de *M. guianensis* descrito acima, adicionado do CP.

5.1.3.1 Análise Citotóxica

A análise citotóxica em *A. cepa* foi realizada com base na germinação dos meristemas (FISKESJÖ, 1985). As raízes foram medidas com 72 horas, após o início da germinação.

De cada bulbo de *A. cepa* foram medidas as três maiores raízes, totalizando 30 raízes por tratamento. A medição foi realizada com régua escolar simples graduada em cm (Figura 12).

Figura 12. Medição das raízes de *A. cepa*.



5.1.3.2 Análise Mutagênica e Índice Mitótico

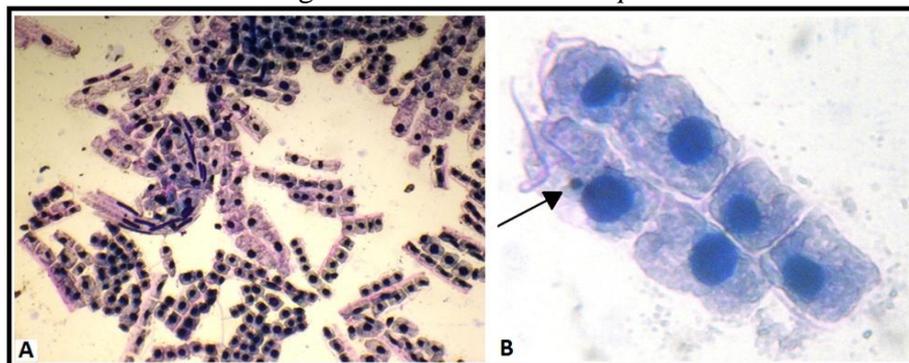
Em torno de 72h após o início do teste, os meristemas foram coletados com 0,1 a 2,5 cm de comprimento, lavados em água destilada, seguida de hidrólise com HCL 1N por 10 minutos em banho-maria a 60C°, sendo os tubos resfriados em água corrente.

Após nova lavagem dos meristemas hidrolisados em água destilada foram realizados esfregaços em duas lâminas por bulbo (totalizando 20 lâminas por tratamento), postas em seguida sob gelo seco por um minuto para retirada da lamínula e aguardado por 30 minutos em temperatura ambiente para secagem. Em seguida, as mesmas foram coradas conforme Meneguetti et al. (2012), utilizando o kit Panótico Rápido composto de três recipientes: primeiro triarilmetano a 0,1%, segundo xantenos a 0,1% e terceiro 5Iiazinhas a 0,1%, sendo as lâminas submersas 10 vezes em cada recipiente com submersões de 1 segundo de duração

na sequência descrita acima (OLIVEIRA; YAMASHITA; MENEGUETTI, 2013; FÃO et al., 2012; SILVA et al., 2012; POLETTO et al., 2011).

Posteriormente as lâminas foram lavadas em água deionizada com o pH 7,0 e secas em temperatura ambiente. Em cada lâmina foram contadas mil células e quantificado a quantidade de micronúcleos (Figura 13 b) e o percentual de células em interfase e mitose.

Figura 13. Células de *A. cepa*.



A: Aumento de 100X; B: Micronúcleo em célula de *A. cepa*, aumento de 400X. Fonte: (MENEGUETTI et al., 2012).

5.1.4 Análise da genotoxicidade aguda em camundongos

3.1.4.1 Tratamento dos animais

Os testes foram realizados de Janeiro a Março de 2014, no Laboratório de Genética e Toxicologia Aplicada do Centro Universitário Luterano de Ji-paraná (CEULJI/ULBRA), no município de Ji-Paraná, Rondônia. Todos os experimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Fundação Oswaldo Cruz – RO, sob o protocolo número: 2013/12.

Foram utilizados camundongos machos e fêmeas da espécie *Mus musculus*, adquiridos no biotério do CEULJI/ULBRA, com peso entre 20 a 40g. Os extratos aquosos da entrecasca de *M. guianensis* foram administrados via oral por gavagem em duas doses 48h e 24h antes do início dos testes. Os animais foram pesados antes da dosagem e o volume administrado foi calculado de acordo com o peso do indivíduo (0,1mL da substância teste por 10g do animal).

Os animais foram divididos em oito grupos, contendo oito animais cada, sendo quatro machos e quatro fêmeas, e esses foram mantidos em ambiente com temperatura controlada de

(25°C) com ciclos de 12h de luz e 12h escuro em gaiolas de polietileno, sendo alimentados com água e ração.

Os grupos foram organizados da seguinte maneira: G1 controle negativo (CN) sendo administrado apenas H₂O. Os grupos G2 a G5 foram tratados com extrato aquoso de *M. guianensis* nas seguintes concentrações: G2 3,85mg/mL; G3 38,5mg/mL; G4 77mg/mL e G5 192mg/mL respectivamente. Os grupos G6 e G7 foram tratados respectivamente com: G6 3,85mg/mL; G7 38,5mg/mL, adicionados de 2,0mg de ciclofosfamida por 100/g do camundongo, tratados por via intraperitoneal, 24 horas antes da aplicação da primeira dose do extrato aquoso de *M. guianensis*, essas concentrações foram escolhidas, baseado em estudo realizado por Meneguetti et al. (2014), onde as mesmas apresentaram ação anticitotóxica e antimutagênica em estudos *in vitro*. Já no G8 controle positivo (CP) foi administrado apenas 2,0mg de ciclofosfamida por 100/g do camundongo (MAGALHÃES et al., 2010), por via intraperitoneal, 24 horas antes da aplicação da primeira dose do extrato aquoso de *M. guianensis*, sendo também tratados com 0,1mL de H₂O por 10g do animal, por meio via oral por gavagem, nos mesmos períodos dos demais grupos.

5.1.4.2 Ensaio cometa

A análise da genotoxicidade e antigenotoxicidade aguda foi realizada por meio do ensaio cometa a partir do método descrito por Singh et al. (1998) e revisado por Tice et al. (2000).

O experimento ocorreu em células sanguíneas de animais submetidos ao tratamento com o extrato aquoso de *M. guianensis*. O sangue periférico dos animais foi coletado após decapitação dos mesmos, com auxílio de uma guilhotina, sendo preparadas duas lâminas por animal.

As amostras em suspensão celular foram misturadas com uma fina camada de agarose “lowmelting” 0,75% e colocadas sobre lâminas pré-cobertas com agarose normal a 1,5%; estas lâminas foram mergulhadas em uma solução de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA e 10 mM Tris, pH 10 com adição de 1% Triton X-100 e 10% DMSO na hora do uso), durante 96 horas a 4°C, para o rompimento das membranas celulares. A lise celular permite a migração dos fragmentos de DNA que foi realizada após a incubação das lâminas em tampão alcalino (300 mM NaOH e 1 mM EDTA, pH > 13) por 20 minutos e subsequentemente aplicado uma

corrente elétrica de 300 mA e 25 V (0,90 V/cm) por 15 minutos em uma cuba de eletroforese de DNA. As lâminas foram neutralizadas logo após a eletroforese com tampão Tris 0,4 M, pH 7,5 e coradas com nitrato de prata.

A análise das células foi realizada randomicamente por meio da avaliação visual em um total de 100 células por lâminas, sendo considerados dois parâmetros: Índice de Danos (0-400) e Frequência de Danos (0-100%).

5.1.4.3 Correlação PCE/NCE e ocorrência de Micronúcleo em medula óssea

5.1.4.3.1 Tampão fosfato

Foram preparadas as soluções (A e B) em separado, para preparo da solução (A), adicionou-se 27,6 g de fosfato de potássio monobásico anidro KH_2PO_4 , por litro do H_2O destilada. Na solução (B) adicionou-se 35,6 g de fosfato de sódio bibásico $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, por litro de H_2O destilada. Em seguida, foi adicionado 16,5mL da solução (A) com 46mL da solução (B) e acrescentou-se 37,5mL de H_2O destilada, completando os 100mL do tampão fosfato com pH 5,8 (SILVA et al., 2011).

5.1.4.3.2 Coleta da medula óssea e preparo das lâminas

Após o sacrifício dos camundongos que foi realizado por decapitação em guilhotina, os fêmures foram retirados, limpos e as duas extremidades removidas com uma tesoura cirúrgica, a medula óssea foi extraída com uma agulha histológica direto sobre a lâmina com 10 μl de soro bovino fetal, com uma agulha histológica curva a medula foi homogeneizada com o soro, sendo feito um esfregão de cada fêmur, sendo preparadas duas lâminas por animal.

As lâminas foram secas em estufa a 37°C, coradas com uma mistura de Giemsa (10%) e tampão fosfato pH 5,8, sendo enxaguadas em água destilada, secas em temperatura ambiente e marcadas com código numérico, para uma análise “cega”. A coloração foi utilizada para diferenciar Eritrócitos Policromáticos (PCE) azul claro e Eritrócitos Normocromáticos (NCE) vermelho (RIBEIRO et al., 2003).

5.1.4.3.3 Análise das lâminas

Foi utilizado o modelo zig-zag, para determinar simultaneamente a quantidade de micronúcleos a cada 1000 PCE e a relação entre PCE e NCE em 1000 células eritróides por lâmina.

Esta relação é realizada para se evitar que se determine falsos-negativos, demonstrando se houve citotoxicidade ou depressão celular (SHHRIMET al., 2006), posteriormente, continuou-se a contagem apenas de micronúcleos em PCE até a quantidade de 1000 células.

A contagem de micronúcleo ocorreu apenas em PCE, devido este ser indicado para análise de organismos com exposição aguda (VILLELA et al., 2003), a mesma utilizada no presente estudo.

5.1.5 Análise estatística

Utilizou-se o software Graphad Prism 5.0 sendo aplicada a Análise de Variância (ANOVA) e o teste Tukey, sendo considerado significativo a partir de $P < 0,05$.

Para o cálculo de Índice Mitótico aplicou-se a seguinte equação: (Número Total de Células em Mitose ÷ Número Total de Células × 100).

5.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.2.1 Citotoxicidade e mutagenicidade em *A. cepa*

Os resultados obtidos por meio das análises toxicológicas, antitoxicológicas, mutagênicas e antimutagênicas do extrato aquoso de *M. guianensis*, são mostrados na Tabela 8.

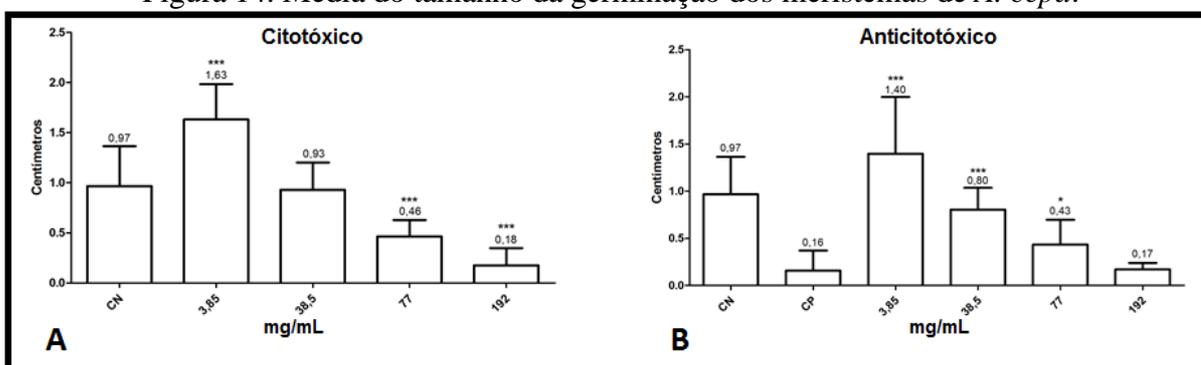
Tabela 8. Tabulação dos dados dos testes de toxicidade, antitoxicidade, mutagenicidade e antimutagenicidade (Concentrações em mg/mL).

Espécimes (<i>A. cepa</i>)	Toxicidade					Antitoxicidade					
	CN	3,85	38,5	77	192	CN	CP	3,85	38,5	77	192
1	1,5	1,8	0,5	0,4	0,2	1,5	1,1	2,4	1,1	0,3	0,2
	1,6	1,9	0,8	0,5	0,1	1,6	0,4	2,2	0,9	0,2	0,2
	1,5	1,1	0,8	0,4	0,1	1,5	0,1	2	0,9	0,2	0,1
2	1,5	1,1	0,8	0,8	0,2	1,5	0	0,5	0,6	0,3	0,2
	1,3	1,4	0,9	0,4	0,2	1,3	0	0,4	0,9	0,3	0,1
	0,9	1	1,4	0,3	1	0,9	0	0,4	0,8	0,3	0,1
3	1,3	2	0,8	0,8	0,2	1,3	0,1	1,6	0,6	0,4	0,3
	1,2	2	1,5	0,6	0,1	1,2	0,1	1,4	0,6	0,1	0,3
	1,4	2,1	1,5	0,7	0,1	1,4	0,1	1,3	0,5	0,1	0,3
4	0,5	1,9	0,8	0,5	0,2	0,5	0,1	2	0,4	0,4	0,2
	0,8	1,6	0,9	0,6	0,2	0,8	0,3	1,9	0,4	0,3	0,1
	1	1,9	0,8	0,6	0,2	1	0,4	1,8	0,4	0,1	0,1
5	0,6	1,9	1,1	0,6	0,1	0,6	0,2	0,7	1,2	0,4	0,2
	0,5	1,7	1	0,5	0,1	0,5	0,4	1	1,1	0,6	0,2
	0,5	1,9	1	0,5	0,1	0,5	0,2	0,6	1,1	0,3	0,2
6	0,8	1,5	0,9	0,3	0	0,8	0	1,2	0,6	0,8	0,1
	0,9	1,2	0,9	0,3	0,1	0,9	0	1,1	0,6	1	0,1
	0,8	1,2	0,8	0,2	0,1	0,8	0	0,9	0,5	0,7	0,2
7	0,6	1,4	0,9	0,4	0,2	0,6	0,2	0,8	1	0,5	0,2
	0,9	1,5	0,8	0,4	0,2	0,9	0,1	0,8	0,9	0,3	0,2
	0,9	1,2	1	0,3	0,2	0,9	0,2	0,9	0,8	0,2	0,3
8	1,4	1,1	1,2	0,2	0,1	1,4	0,1	2	1	0,9	0,1
	0,4	1,8	1,2	0,2	0,1	0,4	0	1,3	1,1	0,8	0,1
	0,2	1,9	1,5	0,3	0	0,2	0	1,1	0,8	0,9	0,2
9	1,5	1,9	0,6	0,6	0,3	1,5	0,1	1,9	0,9	0,7	0,2
	1,4	2,3	0,7	0,6	0,2	1,4	0,1	1,8	1	0,6	0,2
	0,8	1,8	0,8	0,6	0,3	0,8	0,1	2,1	0,9	0,6	0,1
10	0,5	1,5	0,8	0,4	0,1	0,5	0,1	1,9	0,8	0,2	0,1
	0,8	1,4	0,6	0,5	0,2	0,8	0,1	2	0,9	0,2	0,1
	1	1,9	0,6	0,4	0,1	1	0,1	1,9	0,8	0,3	0,1
Média	0,97	1,63	0,93	0,46	0,18	0,97	0,16	1,4	0,8	0,43	0,17

Espécimes (<i>A. cepa</i>)	Mutagenicidade					Antimutagenicidade					
	CN	3,85	38,5	77	192	CN	CP	3,85	38,5	77	192
1	3	0	0	0	7	3	6	4	3	12	8
	0	0	0	0	8	0	10	3	4	9	8
2	0	0	0	3	9	0	8	1	6	3	6
	0	0	0	4	9	0	8	0	2	2	8
3	0	0	0	0	8	0	7	2	8	8	9
	0	0	5	0	7	0	9	2	8	7	8
4	0	2	0	0	6	0	5	1	6	6	11
	0	0	0	4	5	0	6	0	4	5	9
5	3	5	5	3	5	3	4	0	6	9	6
	4	5	0	1	4	4	9	2	2	9	6
6	3	7	0	4	5	3	8	1	3	3	7
	2	4	0	0	4	2	5	3	4	5	5
7	2	0	0	0	6	2	5	0	3	4	6
	3	0	0	0	8	3	9	1	4	8	4
8	0	0	0	0	8	0	10	1	5	6	8
	1	0	0	0	4	1	4	2	4	6	6
9	0	0	0	0	8	0	7	1	3	8	4
	0	3	0	4	5	0	6	3	5	7	8
10	2	5	0	2	5	2	4	1	4	6	9
	1	0	0	0	8	1	11	0	4	6	8
Média	1,2	1,55	0,5	1,25	6,45	1,2	7,05	1,4	4,4	6,45	7,2

Os dados mostram que o extrato aquoso de *M. guianensis* apresenta ação citotóxica nas concentrações de 77 e 192mg/mL ($P<0,001$), (Tabela 9; Figura 14 a), o que não é preocupante visto que essas concentrações são, respectivamente, 20 vezes mais concentradas que a usualmente utilizadas pela população que é 3,85mg/mL (CAMPAROTO et al., 2002). Nas concentrações de 3,85 e 38,5mg/mL, os extratos apresentaram ação antitoxicológica ($P<0,001$), contra os efeitos ocasionado pelo paracetamol na concentração de 800mg/L conforme foi observado no CP (Figura 14 b). Na concentração de 77mg/mL observou-se ação bem como ação antitoxicológica ($P<0,05$), demonstrando que houve uma interação benéfica com o CP.

Figura 14. Média do tamanho da germinação dos meristemas de *A. cepa*.



A: Análise citotóxica; B: Análise anticitotóxica. *($P<0,05$), ** ($P<0,01$) e *** ($P<0,001$). CN: Controle negativo. CP: Controle positivo.

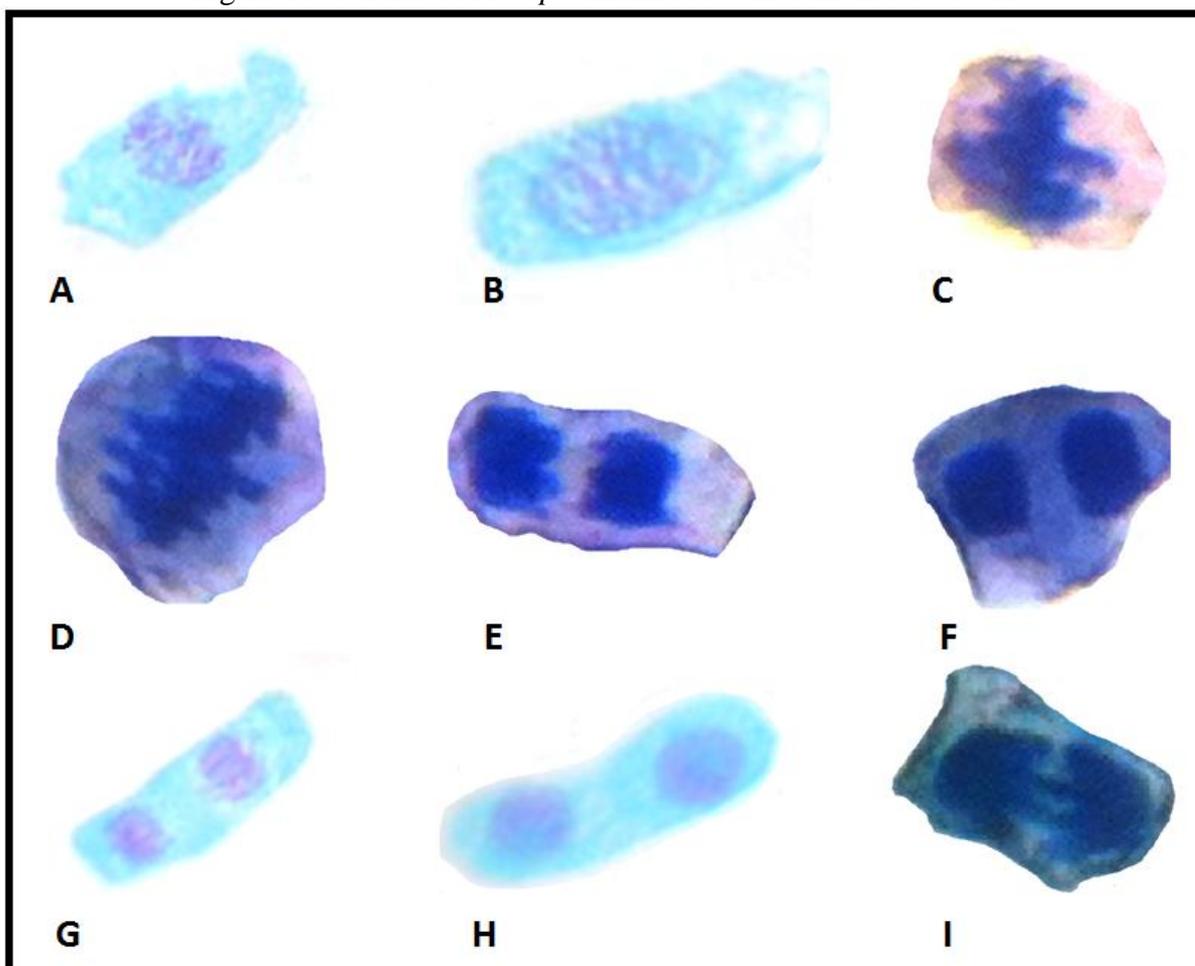
Os resultados da toxicidade e antitoxicidade dos diferentes tratamentos sobre o ciclo celular de *A. cepa* podem ser observados na Tabela 9 e Figura 15.

Tabela 9. Tratamento, número total de células de *A. cepa* analisadas no ciclo celular em Interfase, prófase, metáfase, anáfase e telófase.

Tratamento	Número de Células			Índice Mitótico (%)
	Total	Interfase	Mitose	
CN	20.000	16.720	3.280	16,40
3,85mg/mL	20.000	10.177	9.823	49,11 ***
38,5mg/mL	20.000	17.002	2.998	14,99
77mg/mL	20.000	18.174	1.826	9,13 *
192mg/mL	20.000	18.886	1.114	5,57 ***
CP	20.000	19.011	989	4,94
CP + 3,85mg/mL	20.000	11.099	8.901	44,50 ***
CP + 38,5mg/mL	20.000	17.933	2.067	10,33 ***
CP + 77mg/mL	20.000	18.355	1.645	8,22 *
CP + 192mg/mL	20.000	18.906	1.094	5,47

Significante para *($P<0,05$), ** ($P<0,01$) e *** ($P<0,001$)

Figura 15. Células de *A. cepa* em mitose com aumento de 400X.



A e B: células em prófase; C e D: células em metáfase; E, F e G: células em anáfase; H: células em telófase; I: ocorrência de ponte anafásica.

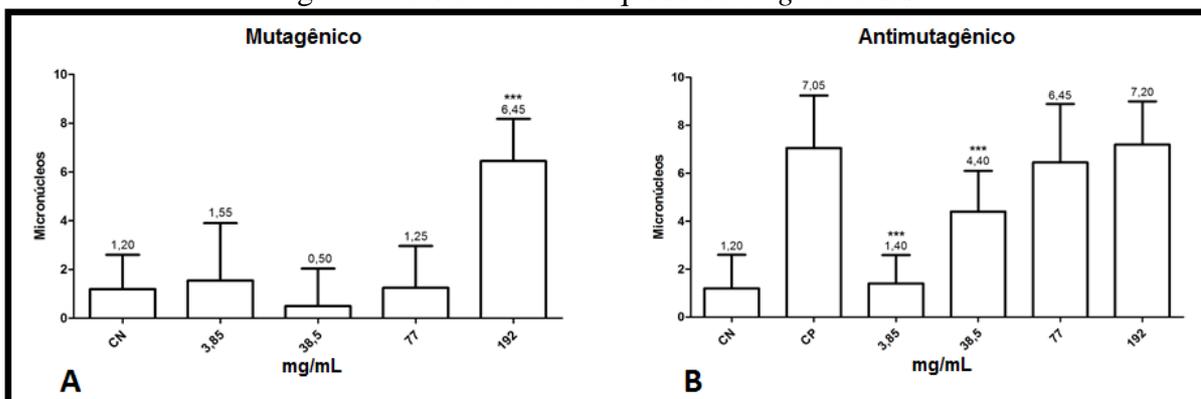
Os resultados mostraram que o tratamento de 3,85mg/mL aumentou a divisão celular de maneira significativa ($P < 0,001$), diferentemente das concentrações de 77mg/mL ($P < 0,05$) e 192mg/mL ($P < 0,001$), que demonstraram ação antiproliferativa do índice mitótico. Esses dados corroboram com os resultados de efeitos tóxicos ocasionados pela concentração de 77mg/mL (Tabela 8; Figura 14 a).

Os tratamentos de 3,85mg/mL ($P < 0,001$), 38,5 mg/mL ($P < 0,001$) e 77mg/mL ($P < 0,05$) apresentaram ação inibitória dos efeitos ocasionados pelo CP, estando de acordo também com os testes antitoxicológicos descritos anteriormente.

O único tratamento que apresentou ação mutagênica foi o de 192mg/mL ($P < 0,001$) (Figura 16 a), sendo observadas nesta concentração algumas pontes anafásicas (Figura 15 i), que são alterações ocorrentes devido à mutagenicidade (STURBELLE et al., 2008).

Nos testes de antimutagenicidade os resultados coincidiram com os de antitoxicidade, tendo ação significativa as concentrações de 3,85 e 38,5mg/mL ($P < 0,001$) (Figura 16 b).

Figura 16. Média do número de micronúcleos encontrados em 1000 células de *A. cepa*, germinadas em extrato aquoso de *M. guianensis*.



A: Análise mutagênica; B: Análise antimutagênica. *($P < 0,05$), ** ($P < 0,01$) e *** ($P < 0,001$). CN: Controle negativo. CP: Controle positivo.

O extrato aquoso da entrecasca *M. guianensis* nas concentrações de 3,85 e 38,5 mg/mL não apresenta ação citotóxica e mutagênica, e ainda atuam como anticitotóxico e antimutagênico, porém, mesmo nessas concentrações é indicado estudos de biacumulação, para um melhor entendimento dos efeitos da utilização desses extratos vegetais a longo prazo (SILVA; FERREIRA, 2003).

O tratamento de 77mg/mL demonstrou ter ação citotóxica e anticitotóxica na presença de paracetamol, porém, não demonstrou ação mutagênica e antimutagênica. A concentração de 192mg/mL demonstrou ser citotóxica e mutagênica. Mesmo com potencial citotóxico e mutagênico dessas concentrações é improvável a ocorrência de ação negativa no corpo humano, visto que a dose utilizada pelas populações tradicionais é 50 vezes inferior a concentração de 192mg/mL.

Os resultados acima descritos estão de acordo com estudo realizado por Hurtado (2013), onde nos testes de atividade genotóxica o extrato acetônico da entrecasca e os eluatos de *M. guianensis* demonstraram atividade antiproliferativa com tempo de exposição prolongado, não apresentando ação clastogênica e aneugênica. Resultado semelhante também foi observado na espécie *M. senegalensis*, que não apresentou atividade mutagênica (REID et al., 2006).

Em outro estudo a análises de células meristemáticas de *A. cepa* demonstrou que concentrações mais elevadas de extrato de *M. ilicifolia* promoveram redução no índice mitótico e nenhum surgimento de alterações cromossômicas (CAMPARATO et al., 2002). Entretanto, Souza et al. (2005) demonstraram que na concentração de 40 mg/mL, houveram alterações cromossômicas (pontes anafásicas) que também foi observado no tratamento de

192mg/mL do presente estudo, sugerindo um potencial genotóxico e efeito alelopático que podem ser explicado pela presença de saponinas, taninos e flavonas ocorrentes na espécie *M. ilicifolia* (MARIOT; BARBIERI, 2007).

A espécie *M. guianensis* produz duas classes de triterpenos na sua entrecasca os friedelanos e os quinonametídeos (HURTADO, 2013), porém, poucos são os estudos que enfatizam os efeitos tóxicos e mutagênicos dos triterpenos de maneira isolada.

Composto triterpenoídico maitensina atua *in vitro* contra células tumorais e em tumores experimentais, onde o extrato de *M. ilicifolia* apresentou atividade inibitória sobre diferentes sarcomas e células neoplásicas (SANTOS-OLIVEIRA; COULAUD-CUNHA; COLAÇO, 2009), reforçando os resultados antimutagênicos das concentrações 3,85 e 38,5mg/mL do extrato aquoso de *M. guianensis*, que ocorreu provavelmente devido a presença de friedelanos que também apresentam atividade citotóxica sobre linhagens tumorais *in vitro* (SHIROTA et al., 1994; ZENG, 1994).

Em outro estudo a espécie *M. guianensis* também não provocou hemólise em eritrócitos humanos, não apresentou efeito coagulante ou anticoagulante até a concentração de 1 mg/mL e ainda demonstrou potencial antiagregante possibilitando a utilização dessa espécie para fins farmacológicos (MAIA; LIMA; VASCONCELLOS, 2009).

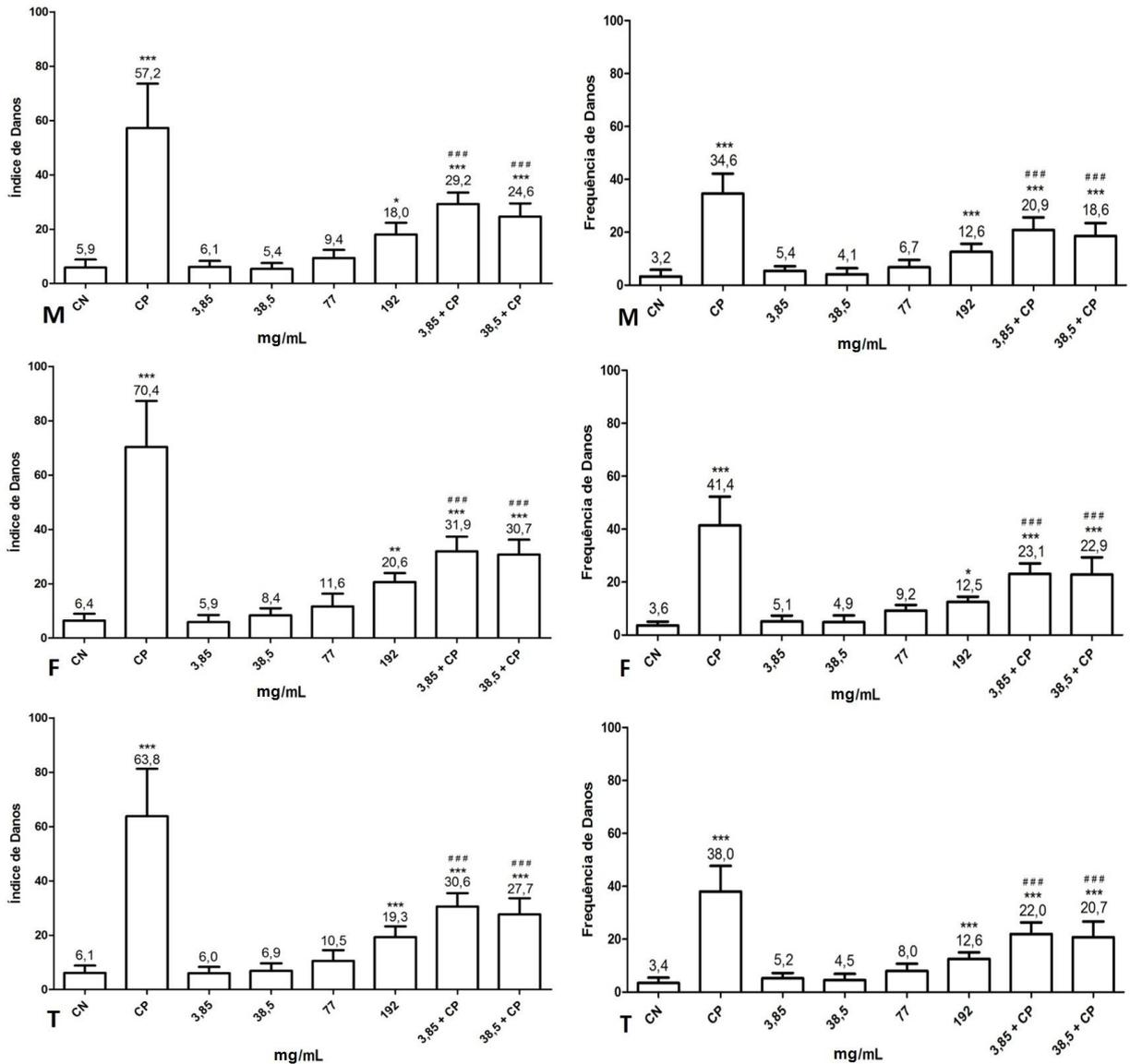
É importante lembrar que apesar da literatura destacar os triterpenos como principais compostos bioativos da família Celastraceae, a mesma também é rica em sesquiterpenos, que podem ser os principais responsáveis por causarem pequenos danos no DNA quando essas plantas são administradas em concentrações elevadas (CORSINO et al., 1998), como observado no presente estudo com 192mg/mL.

5.2.2 Genotoxicidade aguda em camundongos

5.2.2.1 Ensaio cometa

Os resultados de genotoxicidade aguda demonstrados pelo índice e frequência de danos realizados pelo ensaio cometa podem ser observados na Figura 17. As concentrações 3,85mg/mL, 38,5mg/mL e 77mg/mL, não apresentaram efeitos genotóxicos, diferentemente da concentração 192mg/mL que apresentou genotoxicidade significativa em relação ao CN.

Figura 17. Efeito genotóxico e antigenotóxico agudo avaliado em índice de danos e frequência de danos pelo teste cometa em sangue periférico de camundongos, submetidos a tratamento com extrato aquoso de *M. guianensis*.



M: Machos; F: Fêmeas; T: Total – Machos e Fêmeas. Estatisticamente significativa para genotoxicidade *($p < 0,05$), **($p < 0,01$) e ***($p < 0,001$) quando comparado ao CN. Estatisticamente significativa para antigenotoxicidade #($p < 0,05$), ##($p < 0,01$) e ###($p < 0,001$) quando comparado ao CP.

Na análise do potencial antigenotóxico, as duas concentrações testadas 3,85mg/mL, 38,5mg/mL demonstraram redução significativa tanto do índice de danos como da frequência de danos em relação ao grupo do CP.

5.2.2.2 Correlação PCE/NCE

Os dados correspondentes à correlação PCE/NCE influenciados pelo extrato aquoso de *M. guianensis*, estão organizados na Tabela 10. A correlação PCE/NCE das concentrações 3,85mg/mL e 38,5mg/mL não apresentou diferença significativa em relação ao CN. O mesmo não foi observado nas concentrações 77mg/mL e 192mg/mL que diminuíram a correlação, demonstrando a ocorrência de citotoxicidade (SHAHRIMET al., 2006; SILVA et al., 2011), essa que é normalmente confirmada devido ao efeito dose resposta (KRISHNA; HAYASHI, 2000), pois quando não corre esse efeito a provável explicação é a frequência de depressão celular (NESSLANY et al., 2004) o que pode ocasionar apoptose (OUANES et al., 2003), por estar sujeita à regulação do balanço entre a ativação e a repressão da morte celular em determinadas situações (KAUFMANN; HENGARTNER, 2001).

As concentrações 3,85mg/mL e 38,5mg/mL que não apresentaram citotoxicidade, também demonstraram ação anticitotóxica aumentando a correlação PCE/NCE, revertendo significativamente o dano ocasionado pela ciclofosfamida.

5.2.2.3 Micronúcleo em medula óssea

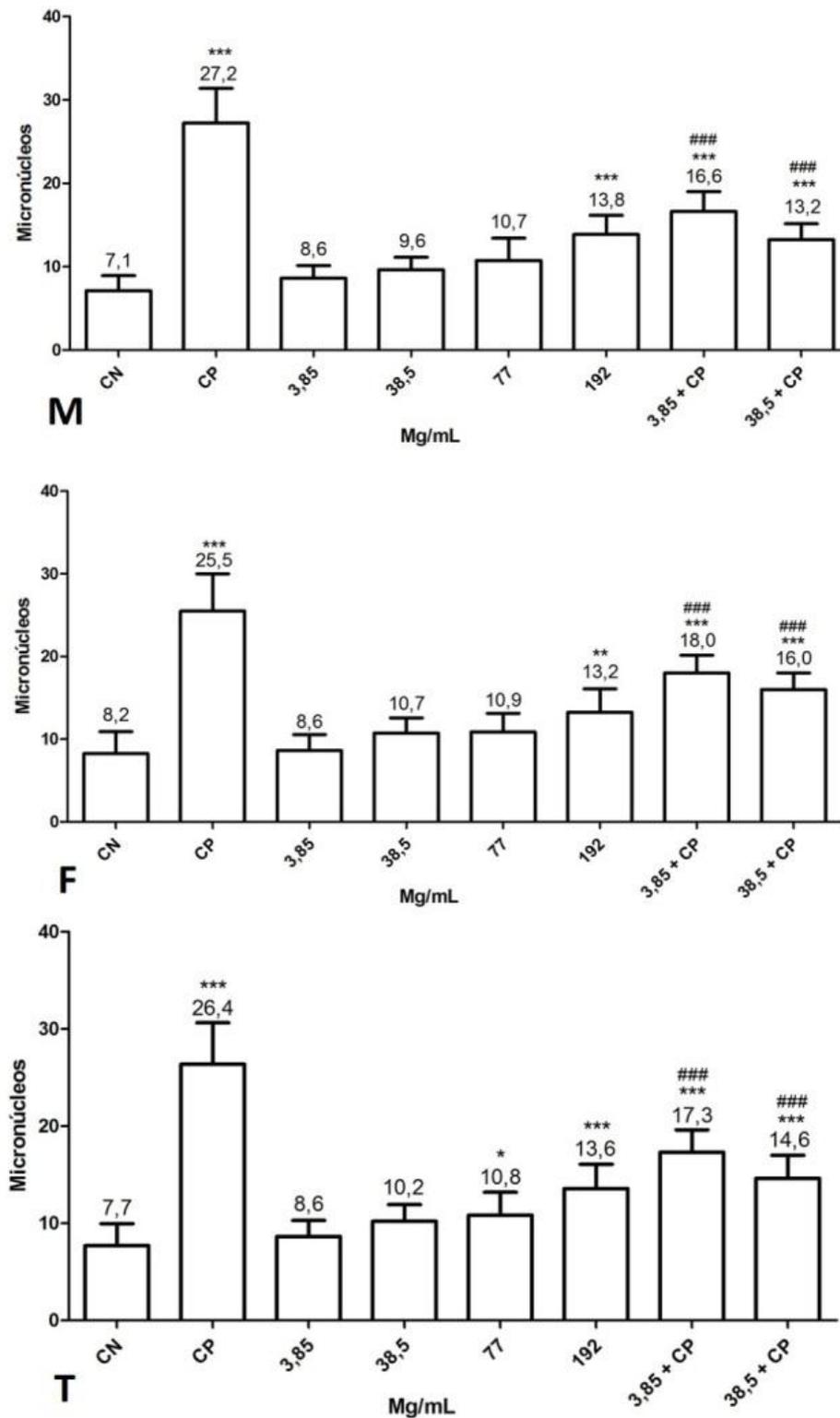
A média de micronúcleos a cada 1000 células da medula óssea de camundongos submetidos ao tratamento com diferentes concentrações do extrato aquoso de *M. guianensis*, pode ser observado na Figura 18.

Tabela 10. Média \pm desvio padrão do número de Eritrócitos Policromáticos (PCE), Eritrócitos Normocromáticos (NCE) e da relação PCE/NCE em células da medula óssea de camundongos, submetidos a tratamento com extrato aquoso de *M. guianensis*.

Tratamento (mg/mL)	Gênero	N	(PCE)	(NCE)	Correlação (PCE/NCE)
CN	Macho	4	257,1 \pm 8,2	242,9 \pm 8,2	1,06 \pm 0,07
	Fêmea	4	261,6 \pm 5,8	238,4 \pm 5,8	1,10 \pm 0,05
	Total	8	259,4 \pm 7,5	240,6 \pm 7,5	1,08 \pm 0,06
CP	Macho	4	183,5 \pm 13,6	316,5 \pm 13,6	0,58 \pm 0,07 *** ^M
	Fêmea	4	173,7 \pm 4,7	326,2 \pm 4,7	0,53 \pm 0,02 *** ^F
	Total	8	178,6 \pm 11,3	321,4 \pm 11,3	0,56 \pm 0,06 *** ^T
3,85	Macho	4	262,2 \pm 8,1	237,7 \pm 8,1	1,10 \pm 0,07
	Fêmea	4	258,1 \pm 6,7	241,9 \pm 6,7	1,07 \pm 0,06
	Total	8	260,2 \pm 7,8	239,8 \pm 7,8	1,08 \pm 0,07
38,5	Macho	4	252,6 \pm 5,8	247,4 \pm 5,8	1,02 \pm 0,05
	Fêmea	4	254,1 \pm 7,3	245,9 \pm 7,3	1,03 \pm 0,06
	Total	8	253,4 \pm 6,6	246,6 \pm 6,6	1,03 \pm 0,05
77	Macho	4	236,2 \pm 13,2	263,7 \pm 13,2	0,90 \pm 0,09 ** ^M
	Fêmea	4	238,1 \pm 11,3	261,9 \pm 11,3	0,91 \pm 0,08 *** ^F
	Total	8	237,2 \pm 12,3	262,8 \pm 12,3	0,90 \pm 0,09 *** ^T
192	Macho	4	216,1 \pm 11,2	283,9 \pm 11,2	0,76 \pm 0,07 *** ^M
	Fêmea	4	216,5 \pm 9,4	283,5 \pm 9,4	0,77 \pm 0,06 *** ^F
	Total	8	216,3 \pm 10,4	283,7 \pm 10,4	0,76 \pm 0,07 *** ^T
3,85 + CP	Macho	4	215,5 \pm 6,6	284,5 \pm 6,6	0,76 \pm 0,04 *** ^{M###M}
	Fêmea	4	219,4 \pm 7,4	280,6 \pm 7,4	0,78 \pm 0,05 *** ^{F###F}
	Total	8	217,4 \pm 7,3	282,6 \pm 7,3	0,77 \pm 0,04 *** ^{T###T}
38,5 + CP	Macho	4	221,2 \pm 8,6	278,7 \pm 8,6	0,79 \pm 0,05 *** ^{M###M}
	Fêmea	4	222,1 \pm 7,9	277,9 \pm 7,9	0,80 \pm 0,05 *** ^{F###F}
	Total	8	221,7 \pm 8,2	278,3 \pm 8,2	0,80 \pm 0,05 *** ^{T###T}

Estatisticamente significante para genotoxicidade^{*M}(p<0,05), ^{**M}(p<0,01) e ^{***M}(p<0,001) quando comparado ao CN macho. ^{*F}(p<0,05), ^{**F}(p<0,01) e ^{***F}(p<0,001) quando comparado ao CN fêmea. ^{*T}(p<0,05), ^{**T}(p<0,01) e ^{***T}(p<0,001) quando comparado ao CN total. Estatisticamente significante para antigenotoxicidade^{#M}(p<0,05), ^{##M}(p<0,01) e ^{###M}(p<0,001) quando comparado ao CP macho. ^{#F}(p<0,05), ^{##F}(p<0,01) e ^{###F}(p<0,001) quando comparado ao CP fêmea. ^{#T}(p<0,05), ^{##T}(p<0,01) e ^{###T}(p<0,001) quando comparado ao CP total.

Figura 18. Efeito mutagênico avaliado pela média do número de micronúcleos em células da medula óssea de camundongos, submetidos a tratamento com extrato aquoso de *M. guianensis*.



M: Machos; F: Fêmeas; T: Total – Machos e Fêmeas. Estatisticamente significativa para mutagenicidade *($p < 0,05$), **($p < 0,01$) e ***($p < 0,001$) quando comparado ao CN. Estatisticamente significativa para antigenotoxicidade#($p < 0,05$), ##($p < 0,01$) e ###($p < 0,001$) quando comparado ao CP.

As concentrações 3,85mg/mL, 38,5mg/mL e 77mg/mL não apresentaram efeitos mutagênicos em camundongos machos e fêmeas, porém, quando foi realizada a média total a concentração 77mg/mL demonstrou-se mutagênica em relação ao CN, essa que também foi observada na concentração de 192mg/mL em camundongos machos, fêmeas e na média total.

Mais uma vez as concentrações 3,85mg/mL, 38,5mg/mL demonstraram efeitos antígeno-tóxico, atuando como antimutagênico, diminuindo significativamente o número de micronúcleos em relação ao CP.

A inocuidade genotóxica e ação antígeno-tóxica das concentrações 3,85mg/mL, 38,5mg/mL do extrato aquoso de *M. guianensis* já foram observadas em estudo utilizando o modelo *A. cepa*, onde as mesmas demonstraram ação anticitotóxica e antimutagênica em relação a germinação dos meristemas, índices mitóticos e formação de micronúcleos (MENEGUETTI et al., 2014b), estando também de acordo com Hurtado (2013), onde frações de *M. guianensis* demonstraram atividade antiproliferativa com tempo de exposição prolongado, não apresentando ação clastogênica e aneugênica, esta que também foram observada em estudo realizado por Mendes et al. (2012), demonstrando que o extrato alcoólico de *M. rígida* não provoca anomalias cromossômicas.

A ação antimutagênica também foi observada por meio do teste Salmonela/Microsoma (Teste de Ames) onde o extrato hidroalcoólico da casca de *M. krukovii* apresentou atividade inibitória contra as linhagens T98 e T100 (BRUNI et al., 2006).

Estudos mostram que os triterpenos quinonametídeos são os principais responsáveis pela ação antígeno-tóxica encontrada em algumas espécies do gênero *Maytenus*, atuando *in vitro* contra células tumorais e em tumores experimentais, tendo a espécie *Maytenus ilicifolia* apresentado atividade inibitória sobre diferentes sarcomas e células neoplásicas (SANTANA et al., 1971; SANTOS-OLIVEIRA et al., 2009), reforçando os resultados encontrados nas concentrações de 3,85 mg/mL e 38,5mg/mL do extrato aquoso de *M. guianensis*, que ocorreu provavelmente devido a presença dos triterpenos quinonametídeos identificados nesta planta (FACUNDO et al., 2015). Resultados similares foram observados com o quinonametídeo tingenona (maitenina) em testes *in vitro* que demonstrou inibição das células neoplásicas Leuk-P 138, CA 9KB e V79 (KUPCHANAND; KARIM, 1976).

Estudo realizados em humanos com outros triterpenos isolados de *Maytenus ssp* demonstram a redução de cerca de 50% das lesões na base da língua e da laringe, ocasionadas por carcinoma epidermoide e 40% do linfopitelioma com invasão para orbita, além de

resultados positivos em 2 de 7 pacientes com carcinoma epidermoide de útero (SANTANA et al., 1971).

Em outra série clínica o triterpeno maitenina “análogo do tingenona” (MORITA et al., 2008; GULLO et al., 2012; FACUNDO et al., 2015) também isolado do gênero *Maytenus* potencializou outras substâncias anticancerígenas de origem natural em onze pacientes com carcinoma basocelular avançado, onde todos os pacientes melhoraram clinicamente, apresentando reduções superiores a 50% do tamanho da lesão (MELO et al., 1974; CORSINO et al., 2000).

Os efeitos antiulcerogênicos ocorrem principalmente devido a atividade antioxidante dos derivados da catequina encontrados em algumas espécies do gênero *Maytenus*, e esses atuam de maneira mais efetiva sobre o tubo digestivo, inibindo a lesão de células da mucosa por radicais livres gerados no processo digestivo, esse efeito relaciona-se também com uma ação antimutagênica, protegendo contra agentes genotóxicos que podem induzir transformação maligna em células da mucosa intestinal (KRULET al., 2001).

A ação antioxidante já foi relatada nas espécies *M. guianensis* (MACARIET al., 2006), *M. procumbens* (MOMTAZ et al., 2013) e *M. ilicifolia* (MACARI et al., 2006; NEGRI et al., 2009) onde inibe a peroxidação lipídica (SANTOS-OLIVEIRA et al., 2009) e demonstra atividade quelante de metais pesados, além de agir sobre diferentes radicais livres (HO et al., 1992; MELO et al., 2001).

No presente estudo a concentração de 77mg/mL do extrato aquoso de *M. guianensis*, não apresentou ação genotóxica para o índice e frequência de danos avaliados pelo teste cometa, e nem para formação de micronúcleos em medula óssea de camundongos machos e fêmeas. Por outro lado, apresentou efeitos genotóxicos na média total do teste de micronúcleo e também na relação PCE/NCE. Os resultados negativos para a concentração de 77mg/mL no teste cometa pode ter ocorrido devido o presente estudo ter analisado apenas os efeitos agudos, sendo indicados estudos futuros para uma melhor compreensão dos efeitos crônicos ocasionado pela ingestão de infusão de extratos aquosos de *M. guianensis*, pois de acordo com Bode e Dong (2014), muitos compostos naturais encontrados em várias plantas consumidas pelas populações tradicionais são potenciais agentes cancerígenos ou promotores de tumores e deve ser evitado seu uso por longos períodos.

Na concentração de 192mg/mL os dados demonstraram efeitos genotóxicos em todos os testes realizados, estando de acordo com estudo realizado por Meneguetti et al. (2014) onde as concentrações de 77mg/mL e 192mg/mL apresentaram ação citotóxica e mutagênica.

É importante lembrar que as concentrações 77mg/mL e 192mg/mL são respectivamente vinte e cinquenta vezes mais concentradas que a usualmente utilizadas pela população que é 3,85mg/mL (CAMPAROTO et al., 2002), o que traz uma certa tranquilidade em relação ao uso dessa espécie na etnofarmacologia.

Essa genotoxicidade encontrada em altas concentrações não foi evidenciada em outros estudos utilizando plantas do mesmo gênero, onde a toxicologia crônica da infusão de *M. ilicifolia* foi testada em ratos e camundongos com doses 20 a 40 vezes maiores que a comumente utilizada por humanos, não havendo alterações no peso, no comportamento, na temperatura e nos parâmetros bioquímicos séricos e hematológicos (CARLINI; FROCHTENGARTEN, 1988).

Em outro estudo toxicológico, desta vez agudo realizado em camundongos e ratos sobre a forma de infusão e extrato liofilizado de *M. ilicifolia*, não foram evidenciados efeitos tóxicos, em doses até 1600 vezes maiores que as utilizadas pelo homem (SANTOS-OLIVEIRA et al., 2009)

Em seres humanos, um estudo de Toxicologia clínica (Fase I), administrou durante 14 dias, o dobro da dosagem de *M. ilicifolia* utilizado na etnofarmacologia, não sendo observados resultados anormais que pudessem ser atribuídos ao uso da planta, apenas sintomas como boca seca, náusea, gastralgia em poucos voluntários, com melhora no decorrer do estudo, demonstrando não ser tóxico para o ser humano quando utilizado da forma da medicina popular (CARLINI; FROCHTENGARTEN, 1988).

Outro ponto importante a ser destacado é que foi possível evidenciar no presente estudo a compatibilidade dos resultados utilizando técnicas de análise em células vegetais (*A. cepa*) e animais (camundongos), esta que foi comprovada em outros estudos (FISKESJO, 1994; BAGATINI et al., 2007) demonstrando a importância da utilização de metodologias alternativas (em células vegetais ou *in vitro*) para a primeira triagem dos estudos de genotoxicidade em extratos vegetais, o que evita o sacrifício desnecessário de dezenas de camundongos.

5.3 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou em células de *A. cepa* inocuidade em relação aos efeitos citotóxicos e mutagênicos em concentrações até 10 vezes maior que a utilizada no uso

tradicional de *M. guianensis*, estas que também não apresentam efeitos genotóxicos e ainda possui ação antígenotóxica em camundongos tratados de forma aguda. Sendo indicados estudos futuros de bioacumulação e dos efeitos crônicos dessa espécie, para melhor compreensão sobre o seu mecanismo de ação, garantindo assim a eficácia e segurança de sua utilização e desenvolvimento de fitoterápicos e fármacos tendo esta espécie como matéria prima.

6. CAPÍTULO IV

Fracionamento, Isolamento e Caracterização dos Constituintes Químicos de *Maytenus guianensis* Klotzsch ex Reissek (Celastraceae) da Floresta Amazônica

Esse capítulo é referente aos dados do artigo:

**Chemical constituents from *Maytenus guianensis* Klotzsch ex Reissek (Celastraceae)
Amazon rainforest**

Publicado no Biochemical Systematics and Ecology – Journal (Anexo IV)



6.1 MATERIAL E MÉTODOS

6.1.1 Preparo do extrato bruto e eluatos

As entrecasas do caule foram secas em estufa (TE-394/2, Tecnal) com ventilação forçada a 50°C por 48 h, sendo em seguida realizada raspagem para retirada da entrecasca visando aumentar a superfície de contato, obtendo-se 1,9 kg, estas que foram extraídas três vezes com acetona (3L x 3) em temperatura ambiente, durante 72h, em cada ciclo. Os extratos foram filtrados em papel filtro e o solvente rotaevaporado (rotaevaporador TE-211, Tecnal) a 80°C onde se obteve o Extrato Acetônico Bruto da Entrecasca (EBC) em quantidade de 200g.

Os eluatos foram preparados a partir de 50g do EBC, sendo fracionado em cromatografia de coluna com sílica gel, por meio de eluição com hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol até a exaustão, dando origem a 14,42 g do Eluato Hexânico da Entrecasca (EHC), 12,55 g do Eluato Clorofórmico da Entrecasca (ECC), 25,81 g do Eluato Acetato de Etila da Entrecasca (EAC) e 28,19 g de Eluato Metílico da Entrecasca (EMC).

As folhas foram secas em estufa (TE-394/2, Tecnal) com ventilação forçada a 50°C por 48h, sendo posteriormente trituradas para aumentar a superfície de contato com o solvente, obtendo-se 1,9 kg de folhas trituradas, estas que foram extraídas três vezes com cada solvente (1,5L x 3) na seguinte ordem de polaridade hexano, clorofórmio, acetato de etila e etanol, obtendo-se 8,11 g de Eluato Hexânico das Folhas (EHF), 10,77 g de Eluato Clorofórmico das Folhas (ECF), 3,50 g de Eluato Acetato de Etila das folhas (EAF) e 4,61 g de Eluato Etanólico das Folhas (EEF).

6.1.2 Isolamento dos metabólitos secundários

Uma porção de 60mg do EBC foi submetida à cromatografia flash usando um sistema de eluição em gradiente de hexano-acetona, 75mL do extrato foram coletados e monitorizados por cromatografia em camada fina (TLC), utilizando misturas de hexano-acetona de polaridade crescente. As frações 3-5 (eluente: hexano-acetona, 80:20) originaram um resíduo de 62,2mg o qual foi submetido a cromatografia flash usando hexano e acetona como fase móvel, para se obter (1) (25,1 mg, eluente: hexano-acetona, 95:05) e (2) (33,2 mg, eluente: hexano-acetona 90:10). As frações 13-85 (eluente: hexano-acetona, 8,5:1,5) foram

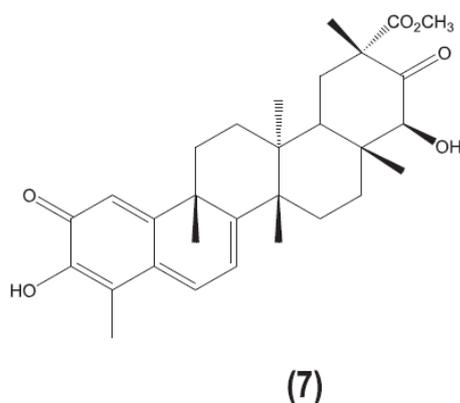
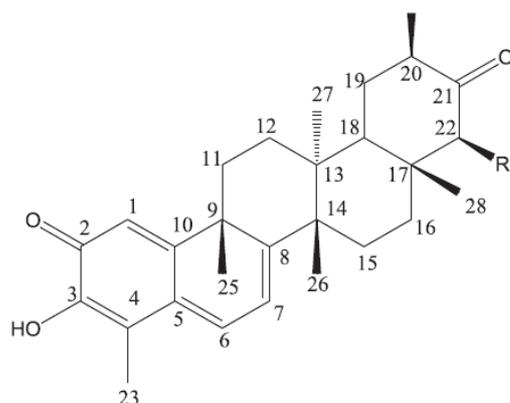
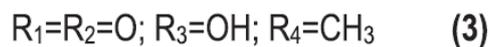
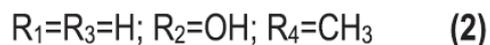
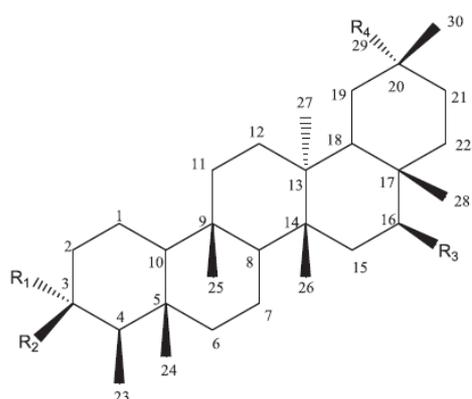
combinados de acordo com a análise por TLC, para se obter a subfração A (736 mg). Esta subfração A, foi adicionalmente cromatografada sobre gel de sílica, eluída com misturas de hexano-acetona de polaridade crescente, para obter (3) (19,9 mg, eluente: hexano-acetona, 90:10), (4) (51 mg, eluente: hexano acetona, 75:25), (5) (33,4 mg, eluente: hexano-acetona, 70:30), (6) (51 mg, eluente: hexano-acetona, 60:40) e (7) (35 mg , eluente: hexaneacetone, 55:45).

Utilizou-se 6,0g do EHF este que foi cromatografada em coluna de gel de sílica (50g), efetuando a eluição com n-hexano, e posteriormente, com n-hexano: CHCl₃ misturados com polaridade crescente. Doze frações de 60mL cada foram recolhidas. A partir destas frações, os compostos (8) com 27,0 mg e (9) com 31,9 mg foram obtidos e purificado por recristalização com éter etílico.

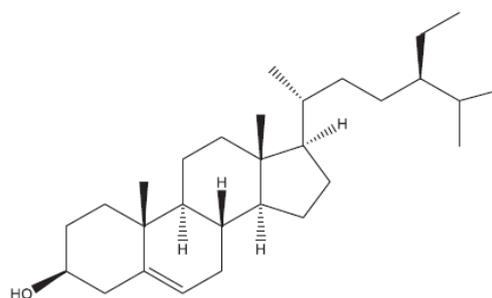
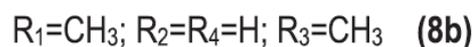
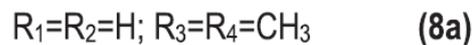
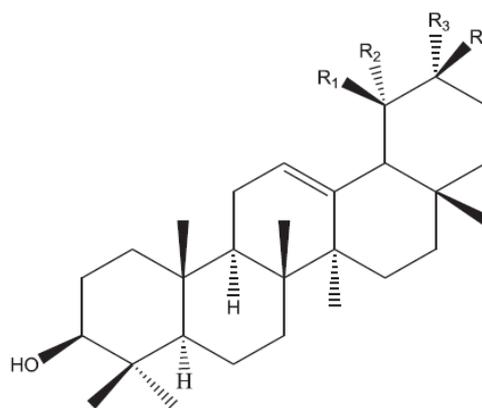
As estruturas de todos os compostos isolados foram elucidadas pela análise de seus dados espectrais (IR, MS, ¹H e ¹³C, incluindo COSY, HMQC, HMBC e NOESY) e por comparação com os dados da literatura.

6.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os isolados foram identificados como friedelina (1) (ALMEIDA et al., 2011), friedelinol (2) (ALMEIDA et al., 2011), 16 β -hidroxifriedelina (3) (DUARTE et al., 2009), 29-hidroxifriedelina (4) (BETACOR et al., 1980), tingenona (5) (SOTANAPHUN et al., 1998), 22 β -hidroxitingenona (6) (LEE et al., 2004) e 22 β -hidroxipristimerina (7) (JELLER et al., 2004) . O composto (8) foi identificada com uma mistura de β -amirina (8a) e α -amirina (8b) (DIAS et al., 2011), e (9) como β -sitosterol (FACUNDO et al., 2008) (Figura 19).

Figura 19. Metabólitos secundários isolados do EHC de *M. guianensis*.

(7)



(9)

(1) Friedelina; (2) Friedelinol; (3) 16 β -hidroxifriedelina; (4) 29-hidroxifriedelina; (5) Tingenona; (6) 22 β -hidroxitingenona; (7) 22 β -hidroxipristimerina; (8) Mistura de β -amirina (8a) e α -amirina (8b); (9) β -sitosterol.

Estudo fitoquímico anterior da casca da raiz de *M. guianensis* relatou a presença de epicalocatequina, proantocianidinas, esteroides, triterpenos e alcaloides sesquiterpene (DE SOUSA et al., 1986).

Os compostos (1), (2), (3), (4), (8a), (8b) e (9) foram previamente obtidos a partir de várias espécies do gênero *Maytenus*, tais como *Maytenus distichophylla* (1, 2 e 4) (DUARTE et al., 2013), *Maytenus obtusifolia* (1 e 4) (DA SILVA et al., 2008), *Maytenus umbellata* (8a) (GONZALES et al., 1986), *Maytenus gonoclada* (1 e 2) (SILVA et al., 2011), *Maytenus robusta* (1, 2 e 4) (SOUSA et al., 2012), *Maytenus phyllanthoides* (8a e 8b) (MOO-PUCA et al., 2014), *Maytenus diversifolia* (1, 3 e 8-A) (NOZAHY et al., 1986).

Os derivados de Friedo-nor-oleanano são membros de um pequeno grupo de produtos naturais, que são típicos e estreitamente relacionados às famílias Celastraceae e Hippocrateaceae (CORSINO et al., 2000). Tingenona (5) foi relatado em *Maytenus acanthophylla* (DE OLIVEIRA et al., 2006), *Maytenus mekongensis* (LHINHATRAKOOL et al., 2011), *Maytenus imbricado* (RODRIGUES et al., 2012), *Maytenus ilicifolia* (SANTOS et al., 2010), *Maytenus vitis-idaea* (ALMEIDA et al., 2010), *Tripterygium regelii* (Celestraceae) (RYU et al., 2010), *Hippocratea excelsa* (Celestraceae) (GONZADO et al., 2007), *Cheiloclinium cognatum* (Hippocrateaceae) (LIAO et al., 2008), *Salacia campestris* (Hippocrateaceae) (CARVALHO et al., 2005) e 22 β -hidroxitingenona (6) foi relatada de *Maytenus retusa* (ORAMAS et al., 2010), *Maytenus chuchuhuasca* (MORITA et al., 2008), *M. ilicifolia* (BUFFA-FILHO et al., 2002), *Maytenus aquifolium* (CORSINO et al., 2000), *Elaeodendron croceum* (Celestraceae) (YELANI et al., 2010), *Elaeodendron schlechteranum* (Celestraceae) (MAREGESI et al., 2010), *Gliptopetalum sclerocarpum* (Celestraceae) (Sotanaphun et al., 1998), *Salacia chinensis* (Hippocrateaceae) (CORSINO et al., 2000) e *S. campestris* (Hippocrateaceae) (CORSINO et al., 2000). O metabólito 22 β -Hidroxipristimerina (7) foi anteriormente obtido a partir de *Cheiloclinium cognatum* (Hippocrateaceae) (JELLER et al., 2004).

6.3 CONCLUSÃO

A presente investigação fitoquímica de *M. guianensis* levou ao isolamento e identificação de nove triterpenos, quatro friedelanos (1), (2), (3) e (4) um oleanano (8a), um

ursano (8b), três Friedo-nor-oleanano (5), (6), (7), e um esteróide, β -sitosterol (9), todos isolados pela primeira vez a partir desta espécie.

É importante destacar que 22 β -hidroxipristimerina (7) foi isolado pela primeira vez a partir da família Celastraceae, tendo sido anteriormente relatado na família Hippocrateaceae. Esta constatação leva a conclusão de que estes derivados Friedo-nor-oleanano, estruturalmente caracterizados por o anel AB, são sistematicamente importantes e podem ser componentes característicos comuns de ambas as famílias Hippocrateaceae e Celastraceae.

7. CAPÍTULO V

Triagem da Ação Antiplasmodial e Antileishmanial *in vitro* de Compostos e Metabólitos Secundários Isolados de *Maytenus guianensis* Klotzsch ex Reissek (Celastraceae) Chichuá Amazônico

Dados a Serem Submetidos à Revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz



7.1 MATERIAL E MÉTODOS

7.1.2 Avaliação da atividade antileishmanial

Os testes foram realizados no Laboratório de Biotecnologia Aplicada à Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) na Unidade de Porto Velho, Rondônia.

7.1.2.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos, 8-10 semanas de idade, obtidos no Biotério da (FIOCRUZ-RO). Os animais foram mantidos em condições padronizadas de biotério. Os experimentos foram realizados de acordo com as normas estabelecidas pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) mediante aprovação do projeto de pesquisa, submetido ao CEUA da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-RO), sob o protocolo número: 2013/12.

7.1.2.2 Parasitos

Foram utilizadas formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8),

As culturas foram mantidas a partir de camundongos previamente inoculados com 10^5 promastigotas de *L. amazonensis*, pela via subcutânea, na pata traseira direita. Após dois meses de infecção, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical, as patas contendo a lesão foram removidas e a pele necrosada retirada, em condições estéreis. O tecido retirado das patas infectadas foi macerado em meio RPMI para obtenção de amastigotas de *L. amazonensis*. O material obtido da maceração foi centrifugado a 1000 rpm por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi removido cuidadosamente e o precipitado suspenso em meio RPMI/SFB (RPMI suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino). Essa cultura foi mantida a 24 °C, durante cerca de cinco dias até a evolução de amastigotas para promastigotas.

7.1.2.3 Cultivo dos parasitas

Para a propagação *in vitro* destas promastigotas, uma alíquota dos parasitos, em fase estacionária de crescimento, foi diluída em eritrosina B 0,04% e contada em câmara hemocitométrica de Neubauer, em microscópio óptico (aumento de 400X). Os parasitos corados de vermelho foram considerados mortos e aqueles birrefringentes e móveis foram considerados vivos. Para obtenção do valor médio dos parasitos em 1 mL, foi realizado o cálculo utilizando-se a fórmula: (nº de parasitos = média dos quatro quadrantes x nº da diluição x 10⁴) (SILVA-JARDIM, 2004). Após a realização dos cálculos, 5x10⁵ promastigotas/mL foram colocadas em meio RPMI/SFB e os parasitas foram mantidos a 24 °C e replicados (a cada cinco dias) por sucessivas passagens, até o máximo de 15 dias.

7.1.2.4 Determinações da atividade antileishmanial

A viabilidade das promastigotas expostas aos compostos foi avaliada por dois métodos: contagem direta e ensaio colorimétrico empregando o sal MTT ((3-4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide). Nos dois métodos aproximadamente 5x10⁵ promastigotas de *L. amazonensis* em início de fase estacionária foram incubadas com 100 µg/mL do composto em diferentes concentrações, a suspensão dos parasitas foi ajustada por meio de contagem realizada em câmara de Neubauer. Para os dois métodos, o controle negativo utilizado foi apenas promastigotas incubadas em meio de cultura e no controle positivo os parasitas foram incubados com solução de Pentamidina a 5 µg/mL. Para o método de contagem o experimento utilizou microtubos (tipo eppendorf) e para o método de MTT foi utilizado placas de cultura de células (96 poços). Os experimentos foram incubados a 25°C durante 48 h. Após o período de incubação os dois métodos se diferiram. No ensaio de contagem direta, uma alíquota de 10 µL dos parasitas de cada tubo foi diluída no corante eritrosina B 0,04% e contada na câmara hemocitométrica de Neubauer, em microscópio óptico (aumento de 400X). Para obter o valor médio de parasitas foi feito um cálculo utilizando-se a fórmula: (nº de parasitas = média dos quatro quadrantes x nº da diluição x 10⁴) e os resultados foram expressos em porcentagem. No ensaio de MTT, a placa foi centrifugada (a 1500 rpm durante 15 minutos a 4°C) e 80 µL do volume do poço da placa foi retirado e o mesmo volume de meio RPMI foi adicionado ao poço. Em seguida 10 µL da

solução de MTT (5 mg/mL), foi pipetado em todos os poços da placa e esta foi incubada por mais 4 h na mesma estufa. Após esse período, o mesmo procedimento de centrifugação foi realizado e 150 µL de DMSO (Dimetil Sulfóxido) foram adicionados à placa. Após novo período de incubação (1h) em temperatura ambiente, as placas foram levemente agitadas e lidas espectrofotometricamente a 570 nm. Como controle negativo foi utilizado apenas células incubadas em meio de cultura, e como controle positivo as células foram incubadas com solução de Pentamidina a 100 µg/mL. Os resultados foram determinados utilizando-se a fórmula 1- (média da densidade óptica/média do controle x 100) e expressos em porcentagem (Citotoxicidade).

7.1.3 Avaliação da atividade antiplasmodial

Os testes foram realizados no Laboratório de Bioensaios de Malária e Leishmaniose da (FIOCRUZ) na Unidade de Porto Velho, Rondônia.

7.1.3.1 Cultivo do *Plasmodium falciparum*

As cepas W2 (resistentes à cloroquina) foram descongeladas e mantidas em cultura de suspensão de hemácias humanas de doadores voluntários do sistema ABO do tipo A ou O com fator Rh(+) com hematócrito de 5%, seguindo a técnica de Trager e Jensen (1976). O cultivo foi realizado em meio completo composto por RPMI 1640 (Sigma) suplementado com 5% de plasma humano desfibrinador A+ ou O+ ou com albumax (Gibco) na concentração final de 1%; Hepes 22,8 mM (Promega); glicose 11,1 mM (Sigma); HPX 0,36 mM (50 µg/mL⁻¹) (Sigma); NaHCO₃ 23,8 mM (Merck); gentamicina 40 µg/mL⁻¹ (Sigma). Os parasitos foram mantidos em estufa a 37°C, condicionados em garrafas de cultura de 25 cm² (Sarstedt) sob tensão de gases (5% de O₂ + 5% de CO₂ + N₂ balanceado). O acompanhamento do desenvolvimento dos parasitos foi realizado por meio da preparação estendida em lâminas (esfregaço) para análise em microscópio óptico em aumento de 1000X.

7.1.3.2 Sincronização dos parasitos para utilização nos testes *in vitro*

Os cultivos com predomínio de anéis utilizados nos ensaios de quimioterapia foram obtidos por sincronização com sorbitol conforme descrito por Lambros e Vanderberg (1979). O meio de cultura foi retirado da garrafa, sendo adicionados ao sedimento contendo o sangue parasitado 10 mL de uma solução de sorbitol 5% e glicose 0,5%.

O conteúdo foi transferido para um tubo de centrifuga de fundo cônico de 15 mL (tipo Falcon) e incubado a 37 °C por 10 min. Após esse período o material foi centrifugado por 5 min a 1000 xg à temperatura ambiente de 24 °C. O sobrenadante foi retirado e o sedimento ressuspendido com meio RPMI suplementado com soro humano A+ ou O+ inativado, ajustando-se o hematócrito para 5%. Essa suspensão após transferência para uma placa de Petri ficou em repouso a 37°C por aproximadamente 10 min para sedimentação das hemácias. Posteriormente a parasitemia foi determinada por meio de esfregaço sanguíneo. O hematócrito e a parasitemia, pré-determinados para cada teste, foi ajustado com a adição de hemácias e meio RPMI completo em quantidades adequadas.

7.1.3.3 Preparo das placas para os ensaios de quimioterapia

Culturas de parasitos sincronizadas com predomínio de anéis de *P. falciparum* foram distribuídas em placas de cultura de 96 poços (KASVI K12-96) adicionando-se 180 µL/poço de meio de cultura RPMI contendo 0,05% de parasitemia e 1,5% de hematócrito para o teste de ELISA anti-HRP2. Anteriormente a adição da suspensão dos parasitos, 20 µL dos compostos a serem testados foram adicionados à placa teste, em triplicata e em diferentes concentrações seriadas (100 - 0.31 mg/mL⁻¹). Os poços controles (seis por teste) continham hemácias normais não tratadas (controle negativo) e hemácias infectadas com o antimalárico Artemisinina (ART) controle positivo, este que foi testado em paralelo em todos os experimentos realizados em diluições seriadas de 500 à 7,8 ηg/mL⁻¹.

7.1.3.4 Teste imunoenzimático anti-HRP2

No ensaio imunoenzimático anti-HRP2 (NOEDL et al., 2002) duas placas de 96 poços (KASVI K12-96) foram preparadas para cada experimento, uma placa-teste contendo os parasitos e os compostos a serem testados, e outra pré-sensibilizada com o anticorpo monoclonal anti-HRP2. As placas-testes foram incubadas por 24 h à 37 °C, e o conteúdo de

seis poços (controle positivo) foi retirado e congelado à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para ser utilizado posteriormente como *background*. A placa foi novamente incubada por 48h nas condições ideais para o crescimento do parasito. Após 72 h de incubação, as placas foram congeladas e descongeladas duas vezes à $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ para que ocorresse a lise das hemácias. Para a sensibilização das placas no teste anti-HRP II, $100\text{ }\mu\text{L}$ do anticorpo primário (MPFM-55A ICLLAB®, EUA) a $1,0\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ foi adicionado a cada poço da placa de ensaio (Maxysorp, Nunc, Denmark). Após incubação por 12 a 16h a 4°C , o conteúdo dos poços foi descartado e $200\text{ }\mu\text{L}/\text{poço}$ da solução de bloqueio (PBS-BSA 2%) adicionada, sendo a placa mantida à temperatura ambiente por 2h. Após esse tempo, o conteúdo dos poços passou novamente por descarte e a placa lavada três vezes com PBS-Tween 20 a 0,05% (PBS-T). A cada poço da placa foram adicionados $100\text{ }\mu\text{L}$ das amostras da cultura de *P. falciparum* hemolisadas. Em seis poços da placa foram adicionados $100\text{ }\mu\text{L}$ dos controles congelados nas primeiras 24h (*background*). A placa foi então incubada por 1h à temperatura ambiente, em câmara úmida, sendo em seguida lavada três vezes com PBS-T, adicionando-se a cada poço $100\text{ }\mu\text{L}$ do anticorpo secundário (MPFG55P ICLLAB®, EUA) diluído a 1:5.000. Após incubação à temperatura ambiente de $24\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1h, em câmara úmida, a placa foi lavada três vezes com PBS-T e $100\mu\text{L}$ de uma solução de TMB – 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB) acrescentados a cada poço. A placa foi incubada entre 5 a 10 min à temperatura ambiente, ao abrigo da luz, e a reação interrompida adicionando-se $50\text{ }\mu\text{L}/\text{poço}$ de solução de ácido sulfúrico 1 mol/L . A leitura das absorvâncias foi realizada à 450nm em espectrofotômetro de microplacas (leitor de ELISA) (BIO-RAD Modelo 3550).

7.1.3.5 Análise estatística antiplasmodial

A determinação da IC_{50} foi realizada a partir de regressão linear, relacionando-se o percentual de inibição em função do logaritmo das concentrações testadas e admitindo-se um intervalo de 99% ($p < 0,01$), para a reta obtida utilizando-se o programa Microcal Origin versão 8.0.

7.1.3.6 Ensaios *in vitro* de citotoxicidade

7.1.3.6.1 Cultivo de linhagens celulares

As linhagens celulares HepG2 (derivada de um hepatoma humano) foram cultivadas como recomendado (CALVO-CALLE et al., 1994). As mesmas foram mantidas em garrafas de cultura de 75cm² (Corning) suplementadas em RPMI contendo 5% de soro fetal bovino (SBF) (Gibco/Invitrogen) e 40mg/L de gentamicina (Schering-Plough). As células foram mantidas em estufa com 5% de CO₂, a 95 % de umidade e a 37°C. O meio das garrafas foi substituído a cada dois dias. Após confluência de cerca de 80%, a cultura de células foi repicada, ou utilizada na realização de ensaios de citotoxicidade. Quando necessário, o congelamento das células foi realizado em ampolas de criopreservação com uma solução contendo 95% de SBF e 5% de DMSO (Sigma-Aldrich).

7.1.3.6.2 Preparo das placas

Para o preparo das placas testes, as células foram lavadas com meio sem SBF, tratadas com 1mL de tripsina-EDTA a 0,25% (Gibco/Invitrogen) e incubadas a 37 °C por 3 min, para que as células se descolassem da garrafa. Ao conteúdo resultante da tripsinização foram adicionados 9mL de meio completo, seguido por centrifugação a 80g por 5min na temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspendido em meio completo contendo 5% SBF. Após a contagem, em câmara de Neubauer, a suspensão foi ajustada para 1x10⁵/mL e 180µL acrescentados a cada poço da microplaca. As células foram incubadas por 12 à 16h em estufa de CO₂ a 37 °C para adesão aos poços da microplaca. Em seguida, 20µL de meio completo contendo diferentes concentrações dos compostos (1000 - 1µg/mL) foram adicionados aos poços da microplaca. As placas foram incubadas por 24 h a 37 °C, 5% de CO₂ e 95% de umidade.

7.1.3.6.3 Ensaio de citotoxicidade utilizando MTT

A citotoxicidade foi determinada por meio do método colorimétrico do MTT (3-[[4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio]) (MADUREIRA et al., 2002). Após 24 horas

foi adicionado em cada poço, 20µL de MTT a uma concentração de mg/mL^{-1} em PBS (p/v) e as placas ficaram por três horas em estufa 37 °C. Ao final desse período, o meio de cultura, juntamente com o excesso de MTT, foi desprezado e em seguida, 100µL de DMSO (Sigma-Aldrich) foram adicionados a cada poço. A leitura óptica foi feita utilizando um espectrofotômetro de microplacas em λ de 570 nm.

7.1.3.6.4 Determinação da dose letal mínima (MDL₅₀) e índice de seletividade

A MDL₅₀ para a linhagem HepG2, foi determinada por meio de curvas dose-resposta, em função de regressão não linear, sendo utilizado o programa Origin (OriginLab Corporation, Northampton, MA, EUA), para calcular o mesmo.

O índice de seletividade (IS) das amostras testadas foi obtido calculando-se o valor de MDL₅₀ HepG2 dividido pelo valor de IC₅₀ da cepa W2 de *P. falciparum*. Valores maiores que 25 foram considerados não tóxicos, maiores que 10 e menores que 25 foram considerados parcialmente tóxicos, enquanto substâncias com valores abaixo de 10 foram consideradas tóxicas (BÉZIVIN et al., 2003).

7.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.2.1 Ação antileishmanial

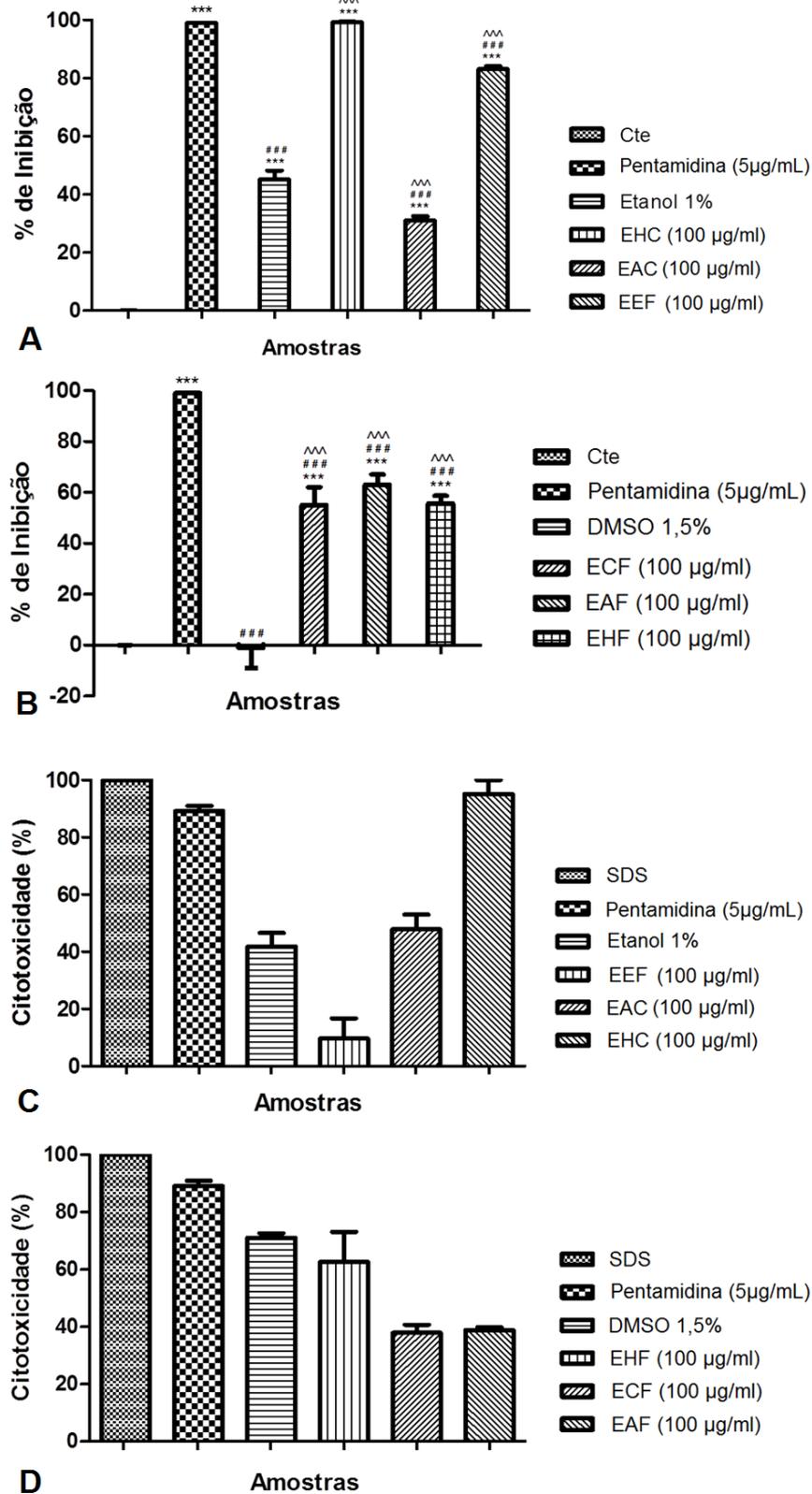
Os eluatos utilizados para o teste Antileishmanial foram: EHC, EAC, EHF, ECF, EAF e EEF. No método de contagem direta, os compostos que apresentaram melhores resultados foram EHC e EEF para os eluatos solubilizados em etanol, com 100% e superior a 80% de inibição, respectivamente (Figura 20a). Já utilizando o solvente DMSO os eluatos EAF com inibição superior a 60% e ECF e EHF ambos com inibição superior a 50% foram os que apresentaram os melhores resultados (Figura 20b).

O EHC também foi o que apresentou os melhores resultados no teste MTT, com mais de 90% de citotoxicidade (Figura 20c), seguido do EHF que apresentou mais de 60% (Figura 20d).

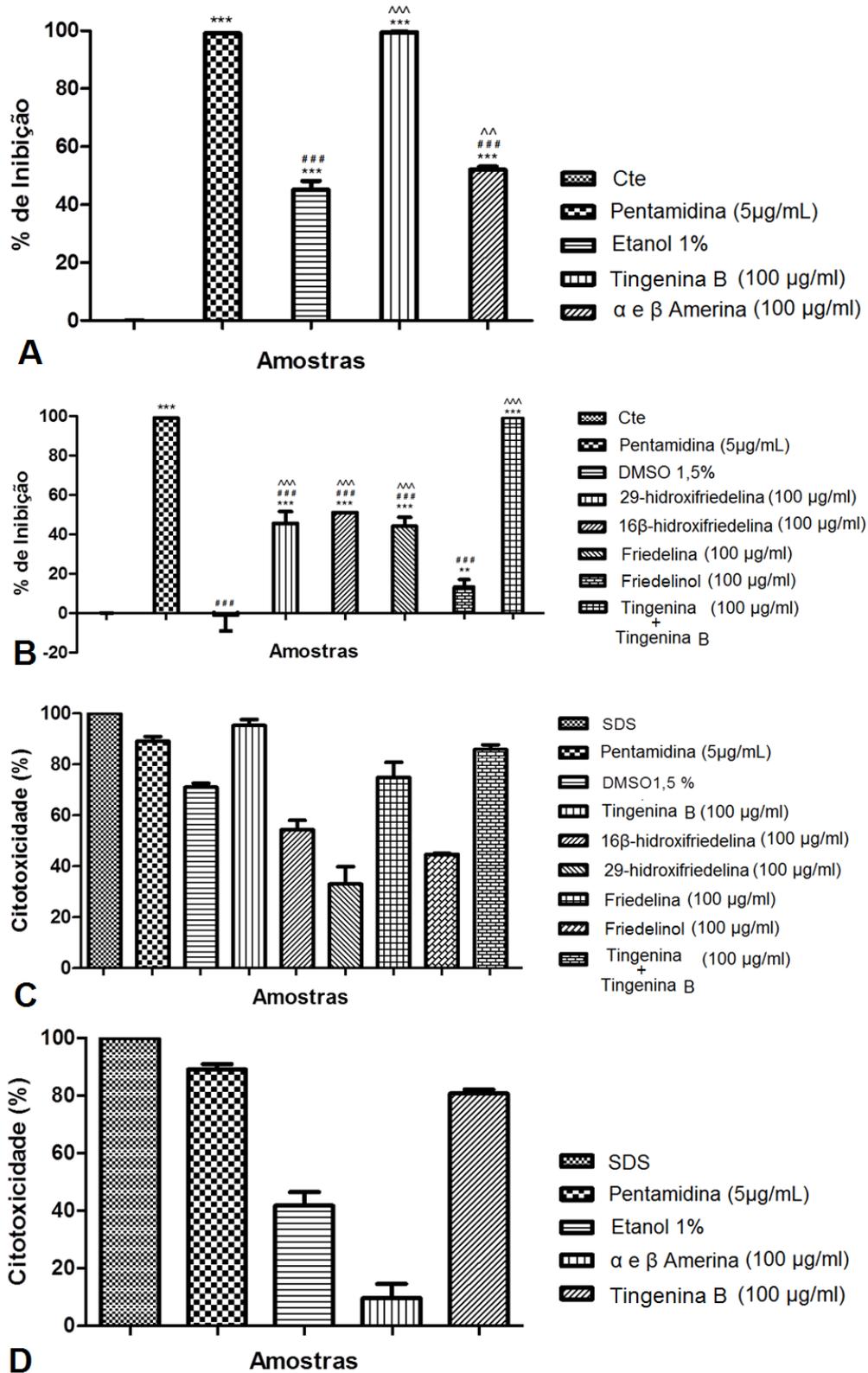
A ação antiparasitária de eluatos hexânicos contra promastigotas de *Leishmania*, já foi observado em outras espécies da região amazônica, tais como *Annona foetida* (COSTA et al., 2006), *Garcinia brasiliensis* (PEREIRA et al., 2011) e *Lacistema pubescens* (SILVA et al., 2014a) contra *L. amazonensis*, *Gustavia elliptica* contra *L. braziliensis* (ALMEIDA et al., 2011) e *Guarea kunthiana* e *Casearia sylvestris* contra *L. donovani* (MESQUITA et al., 2005).

Uma das prováveis explicações para a atividade antileishmanial de extratos e eluatos hexânicos é a presença de terpenóides, estes que apresentam afinidade com a polaridade do hexano, e são encontrados em várias espécies do gênero *Maytenus* (PINHEIRO, 1980; GONZALEZ et al., 1982; BAUDOUIN et al., 1984; ITOKAWA et al., 1993; SHIROT et al., 1998; SALAZAR et al., 1999; PIACENTE et al., 1999; NAKAGAWA et al., 2004; DA SILVA et al., 2008; HURTADO, 2013; FACUNDO et al., 2015).

Os melhores resultados antileishmanial com metabólitos secundários foram para a Tingenina B solubilizada em etanol (Figura 21a) e Tingenina + Tingenina B solubilizada em DMSO (Figura 21b) ambos com 100% de inibição de promastigotas no método de contagem direta, e citotoxicidade superior a 90% e 80% para o Tingenina B e 80% para Tingenina + Tingenina B (Figura 21c e d) no teste MTT.

Figura 20. Ação antileishmanial de eluatos de *M. guianensis*.

A e B método de contagem direta: as médias \pm DP com diferença estatisticamente significante foram representadas pelos símbolos *** $P < 0,001$, quando comparadas ao controle negativo - Cte (*L. amazonensis* em meio de cultura); ### $P < 0,001$ quando comparadas ao controle positivo (pentamidina); ^^^ $P < 0,001$, quando comparadas ao controle do solvente (Etanol ou DMSO). C e D método MTT: controle positivo inespecífico (dodecil sulfato de sódio - SDS). Controle positivo (pentamidina). Controle do solvente (Etanol ou DMSO).

Figura 21. Ação antileishmanial de metabólitos secundários isolados de *M. guianensis*.

A e B método de contagem celular: as médias \pm DP com diferença estatisticamente significativa foram representadas pelos símbolos *** $P < 0,001$, quando comparadas ao controle negativo - Cte (*L. amazonensis* em meio de cultura); ### $P < 0,001$ quando comparadas ao controle positivo (pentamidina); ^^^ $P < 0,001$, quando comparadas ao controle do solvente (Etanol ou DMSO). C e D método MTT: controle positivo inespecífico (dodecil sulfato de sódio - SDS). Controle positivo (pentamidina). Controle do solvente (Etanol ou DMSO).

Tingenina B tem demonstrado em outros estudos atividade antiparasitária contra *Trypanosoma cruzi* $IC_{50} < 0.25 \mu\text{g/mL}$, *Trypanosoma brucei* $IC_{50} < 0.25 \mu\text{g/mL}$ e *Leishmania infantum* $IC_{50} < 0.51 \mu\text{g/mL}$ (Maregesi et al., 2010).

Torres-Santos et al. (2004) e Teles et al. (2011) realizaram estudos da ação de triterpenos isolados sobre as formas promastigotas de *L. amazonensis* e descobriram que a presença do grupamento ácido carboxílico confere a atividade antiprotozoária e triterpenos pentacíclicos com maior número de grupamentos hidroxilas apresentam maior ação antipromastigotas, esta característica química também é observada na tingenina B.

Tingenina B é um triterpeno pentacíclico com esqueleto quinonametídeo, e outros compostos com esse mesmo esqueleto tem demonstrado um grande potencial para produção de drogas mais potentes contra leishmaniose (SANTOS et al., 2013) e doença de Chagas (LIÃO et al., 2008; SANTOS et al., 2013)

Outros estudos demonstram que os triterpenos, estimulam a granulocitose e fagocitose, auxiliando no combate à infecção (AKIHISA et al., 1996), provocando extravasamento citoplasmático, formação de corpúsculos lipídicos e inchaço mitocondrial (TELES et al., 2015). Porém, mesmo com essas informações até o momento o mecanismo de ação pelo qual os triterpenos inibem o crescimento de formas promastigotas de *Leishmania* spp ainda não foi totalmente elucidado (LIMA et al., 2011).

7.2.2 Ação antiplasmodial

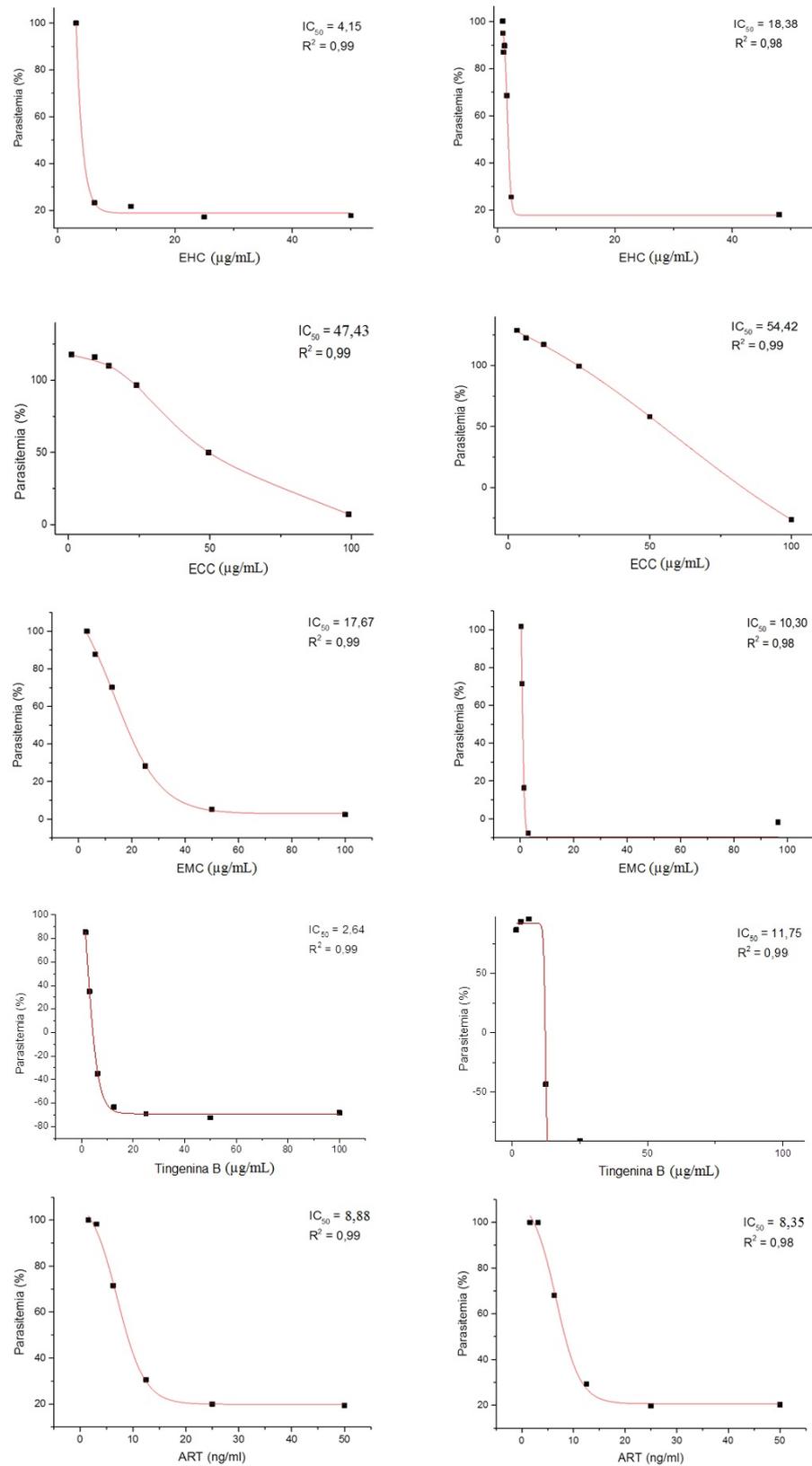
Os eluatos utilizados para o teste Antileishmanial foram: EHC, ECC, EAC e EMC, tendo apresentado a melhor ação anti-*P. falciparum* o EHC com $IC_{50} < 1,563 \mu\text{g/mL}$, seguido do EMC e ECC com $IC_{50} = 32,22 \mu\text{g/mL}$ e $50,92 \mu\text{g/mL}$ respectivamente (Tabela 1). Já entre os metabólitos o que demonstrou melhor efeito antiplasmodial foi Tingenina B (Tabela 11 e Figura 22).

Tabela 11. Atividade anti-*P. falciparum* (cepa W2) de eluatos e metabólitos secundários isolados de *M. guianensis*.

Amostras	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) Placa 1	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) Placa 2	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) (média \pm DP)
Eluato Hexânico da Entrecasca (EHC)	4,15	18,38	= 11,26 \pm 7,11**
Eluato Clorofórmico da Entrecasca (ECC)	47,43	54,42	= 50,92 \pm 3,49**
Eluato Acetato de Etila da Entrecasca (EAC)	> 100	> 100	> 100*
Eluato Metílico da Entrecasca (EMC)	17,67	10,30	= 13,98 \pm 3,68 **
29-hidroxifriedelina	> 100	> 100	> 100*
Friedelina	> 100	> 100	> 100*
Friedelinol	> 100	> 100	> 100*
Tingenina B	2,64	11,75	= 7,19 \pm 4,55***
Artemisinina (ART)	0,0088	0,0083	= 0,0085 \pm 0,00025***

IC_{50} : Concentração inibitória de 50% da população em teste: IC_{50} atividade baixa *($IC_{50} > 100$); IC_{50} atividade moderada **($10 < IC_{50} > 100$); IC_{50} atividade alta ***($IC_{50} \leq 10$).

Figura 22. Atividade anti-*P. falciparum* (cepa W2) de eluatos e Tingena B isolado de *M. guianensis*.



IC_{50} : Concentração inibitória de 50% da população em teste. R^2 : Análise de Regressão.

Tabela 12. Índice de seletividade primário de eluatos e Tingenina B isolado de *M. guianensis*.

Amostras	IC ₅₀ (µg/mL) (média ± DP)	MTT - HepG2 MDL ₅₀ (µg/mL) ± DP	IS
Eluato Hexânico da Entrecasca (EHC)	= 11,26 ± 7,11	= 5,9 ± 1,9	≈ 0,52***
Eluato Clorofórmico da Entrecasca (ECC)	= 50,92 ± 3,49	> 500	≈ 9,81***
Eluato Metílico da Entrecasca (EMC)	= 13,98 ± 3,68	> 500	≈ 35,76*
Tingenina B	= 7,19 ± 4,55	> 250	≈ 34,78*
Artemisinina (ART)	= 0,0085 ± 0,00025	> 50	≈ 5882,35*

IC₅₀: Concentração inibitória de 50% da população em teste. MDL₅₀: Dose letal mínima para 50% da população em teste. IS: Índice de seletividade: IS não-tóxico *(IS>25); IS parcialmente tóxico ***(10<IS>25); IS tóxico ***(IS≤10).

A ação antiplasmodial de eluatos hexânicos contra *P. falciparum*, também já foi observada em outras espécies da região amazônica, tais como: *Xylopia aromática*, *Anemopaegma arvense*, *Cybistax antisiphilitica* e *Casearia sylvestris* (MENEGUETTI et al., 2015a).

A ação antioxidante da espécie *M. guianensis* (MACARIET al., 2006) inibe a peroxidação lipídica (SANTOS-OLIVEIRA et al., 2009) e demonstra atividade quelante de metais pesados, além de agir sobre diferentes radicais livres (HO et al., 1992; MELO et al., 2001), o que pode ter relação com o efeito anti-*P. falciparum* observado no presente estudo.

Em outro estudo o EHC de *M. guianensis* demonstrou uma alta ação anti- *P. falciparum*, porém, contra cepa 3D7 (sensível à cloroquina) com IC₅₀=0,3µg/mL (HURTADO, 2013), resultados bem superiores aos encontrados no presente estudo contra a Cepa W2.

Foi constatado que o EHC *M. guianensis* é rico em triterpenos, o que já havia sido descrito por Facundo et al. (2015) com estudo dos constituintes químicos da espécie. A presença desses terpenóides pode justificar a eficácia antiparasitária que é demonstrada por vários estudos (MAES et al., 2004; TORRES-SANTOS et al., 2004; SULSEN et al., 2008; DANELLI et al., 2009; TELES et al., 2011; SANTOS et al., 2013; BARRERA et al., 2013; BEGUM et al., 2014; TOLEDO et al., 2014; SILVA et al., 2014b; BERNAL; COY-BARRERA, 2014).

A atividade antiplasmodial moderada do EHC, EMC e ECC pode estar correlacionada ao efeito sinérgico entre os triterpenos existentes nestes eluatos. Essa ação já foi observada com a combinação entre terpenóides e inibidores da atividade proteolítica do proteossomo, o que potencializou a ação antimalárica (GOULART, 2006). Os metabólitos secundários quando administrados concomitantemente com outros, podem apresentar diferentes efeitos

dos apresentados pelos mesmos isoladamente, podendo diminuir a toxicidade, profilaxia no desenvolvimento de resistência dos parasitas as drogas, ou até mesmo apresentar a ação inversa, com aparecimento de efeitos tóxicos, diminuição da ação de uma ou mais drogas, ou até mesmo o aparecimento de um novo efeito que não é observado nos fármacos utilizados isoladamente (FIVELMAN et al., 2004).

Na busca de novos fármacos antimaláricos algumas combinações se demonstram eficazes, tais como: Malarone (combinação de atovaquone e proguanil) (SRIVASTAVA et al., 1997), Lapdap (combinação de cloroproguanil e dapsoma), Coartem (combinação de artemisinina e lumefantrina) e outras terapias que combinam derivados de artemisinina com artesunato-melgoquina, que além de potencializar o medicamento demonstrou eficácia na prevenção da resistência do parasita a droga (SILVA, 2012), efeito semelhante também foi observado com a combinação entre fosmidomicina, lincosamida, lincomicina e clidamicina em testes *in vitro* e *in vivo* (WIESNER et al., 2002).

O EHC apresentou elevada citotoxicidade contra a linhagem celular HepG2 (célula neoplásica de fígado humano), o que desencoraja a realização de estudos futuros com esses eluatos contra *P. falciparum*. No entanto é importante lembrar que células HepG2 também são utilizadas para avaliação da genotoxicidade e antigenotoxicidade de extratos de plantas medicinais e componentes bioativos (ANGELI et al., 2010; YANG et al., 2011; PILLAY et al., 2013; SOUZA et al., 2013), sendo que a elevada citotoxicidade contra HepG2 pode representar uma possível atividade anticancerígena do EHC, o que vem de encontro com resultados antigenotóxicos descritos para o extrato aquoso de *M. guianensis* (MENEGUETTI et al., 2014b; MENEGUETTI et al., 2015b), sendo indicado estudos futuros para avaliação deste potencial.

Em outra pesquisa o metabólito Tingenina B isolado demonstrou atividade contra cepas de *Plasmodium falciparum* (sensíveis à cloroquina) com $IC_{50}=0.36\mu\text{g/mL}$, além de atividade microbiológica contra *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* ambos com $IC_{90}<0.25\mu\text{g/mL}$ (MAREGESI et al., 2010), apresentando também efeito significativo contra *Bacillus subtilis*, *Sarcinia lutea*, *Klebsiella pneumoniae* e *Microsporum gypseum* com a Concentração Inibitória Mínima (MIC) de 1,0, 1,0, 4,0 e 4,0 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (SOTANAPHUN et al., 1998). Também é relevante destacar que Tingenina B tem demonstrado atividade antitumoral (UFMG, 2015; SHIROTA et al., 1994; BAVOVADA, 1990), e no presente estudo não demonstrou ação citotóxica contra células

HepG2, demonstrando um grande potencial deste metabólito, tanto para ação antiplasmodial como antigenotóxica.

A ação antiparasitária do EHC (rico em triterpenos) e do triterpeno Tingenina B pode estar relacionada com a lise da membrana plasmática do parasita, o que ocasiona o esgotamento dos gradientes iônicos, efluxo de nutrientes e outros componentes citoplasmáticos, provocando consequentemente a morte celular, tanto em *Plasmodium* como em *Leishmania* (MARR et al., 2012).

Outras prováveis explicações para a ação antiparasitária desses terpenóides seria a ativação da morte celular programada nestes parasitos, uma vez que este processo já foi identificado tanto em *Plasmodium* quanto *Leishmania* (MESLIN et al., 2011) e a interferência de uma ou mais substâncias no processo de diferenciação celular destes parasitos em seus hospedeiros, o qual demonstra ser um processo extremamente complexo, com ajuste fino da regulação da expressão gênica, resultando em um *turnover* de proteínas e destruição de organelas, este que também pode ocorrer tanto em *Plasmodium* quanto em *Leishmania*, além de outras espécies de protistas patogênicos (DUSZENKO et al., 2011).

7.3 CONCLUSÃO

Constatou-se que o EHC de *M. guianensis*, apresentou os melhores resultados entre os eluatos contra cepa W2 de *P. falciparum* com $IC_{50} = 11,26 \mu\text{g/mL}$ e *L. amazonensis* com inibição entre 90 a 100% das formas promastigotas, porém, este eluato apresentou citotoxicidade contra linhagem celular HepG2. Já entre os metabólitos isolados do EHC, o que apresentou melhor resultado contra *P. falciparum* foi a Tingenina B com $IC_{50} = 7,19 \mu\text{g/mL}$. Este que seguido do Tingenina + Tingenina B apresentam os melhores resultados contra promastigotas de *L. amazonensis*, com inibição ficando entre 80 a 90%.

Foi possível evidenciar que a espécie *M. guianensis* possui potencial antiparasitológico com atividade antiplasmodial e antileishmanial, sendo indicados estudos futuros para elucidação do mecanismo de ação dos mesmos e avaliação do potencial genotóxico dos eluatos e metabólitos secundários isolados, a fim de potencializar a eficácia etnofarmacológica e minimizar os possíveis efeitos adversos.

8. CONCLUSÕES GERAIS

Constatou-se que a espécie *M. guianensis* possui potencial anticitotóxico, antimutagênico, antigenotóxico e antiparasitológico com atividade antiplasmodial e antileishmanial.

Por meio do teste de *A. cepa* foi possível evidenciar a inocuidade em relação aos efeitos citotóxicos e mutagênicos em concentrações até 10 vezes maiores que a utilizada no uso tradicional de *M. guianensis*, além de um potencial anticitotóxico e antimutagênico nas mesmas concentrações, essas que também não apresentam efeitos genotóxicos e ainda possui ação antigenotóxica em camundongos tratados de forma aguda. Sendo indicados estudos futuros de bioacumulação e dos efeitos crônicos dessa espécie, com o intuito de garantir sua eficácia e segurança para o desenvolvimento de fitoterápicos e/ou fármacos.

A investigação fitoquímica em *M. guianensis* levou ao isolamento de nove triterpenos, incluindo friedelanos, Friedo-nor-oleanano, oleanano e ursano e um esteróide. Todos foram isolados a partir desta espécie pela primeira vez. Também foi possível observar que a presença de triterpenos Friedelanos pode ser empregada como os componentes comuns das famílias Hippocrateaceae e Celastraceae.

Na investigação antiparasitária detectou-se que o EHC de *M. guianensis*, apresentou os melhores resultados entre os eluatos contra cepa W2 de *P. falciparum* com $IC_{50}=11,26\mu\text{g/mL}$ e *L. amazonensis* com inibição entre 90 a 100% das formas promastigotas, porém, este eluato apresentou citotoxicidade contra linhagem celular HepG2. Já entre os metabólitos isolados do EHC, o que apresentou melhor resultado contra *P. falciparum* foi o Tingenina B com $IC_{50}=7,19\mu\text{g/mL}$, este que seguido do Tingenina + Tingenina B apresentam os melhores resultados contra promastigotas de *L. amazonensis*, com inibição ficando entre 80 a 90%.

Foi possível observar que a espécie *M. guianensis* possui um potencial antiparasitológico com atividade antiplasmodial e antileishmanial, sendo necessários estudos futuros para elucidação do mecanismo de ação dos mesmos e avaliação do potencial genotóxico dos eluatos e metabólitos secundários isolados, a fim de potencializar a eficácia etnofarmacológica e minimizar os possíveis efeitos adversos.

REFERÊNCIAS

ABREU, A.S.; BARBOSA, P.S.; MÜLLER, A.H.; GUILHON, G.M.S.P. Constituintes químicos do caule e das cascas do caule de *Croton pullei* var. *Glabrior* (Euphorbiaceae). **Rev Virt Inic Acad da UFPA.**, v. 1, n. 2, p. 1-9, 2001.

AGUILAR, R. **Vascular plants of the osa peninsula, Costa Rica - *Maytenus guyanensis* Klotzsch.** Disponível em <https://www.flickr.com/photos/plantaspinunsulaosa/6680344681/in/photostream/>. Acessado em 04/01/2015.

AKIHISA, T.; YASUKAWA, K.; OINUMA, H.; KASAHARA, Y.; YAMANOUCHI, S.; TAKIDO, M.; Kumaki, K.; Tamura, T. Triterpene alcohols from the flowers of compositae and their anti-inflammatory effects. **Phytochemistry.**, v. 43, n.6, p. 1255-1260, 1996.

ALLISON, A.C.; CACABELOS, R.; LOMBARDI, V.R.M.; ÁLVAREZ, X.A.; VIGO, C. Celastrol, a potent antioxidant and anti-inflammatory drug, as a possible treatment for Alzheimer's disease. **Biol Psychiat.**, v. 25, n. 7, p. 1341-1357, 2001.

ALMEIDA, M.F.O.; MELO, A.C.R.; PINHEIRO, M.L.B.; SILVA, J.R.A.; SOUZA, A.D.L.; BARISON, A.; CAMPOS, F.R.; AMARAL, A.C.F.; MACHADO, G.M.C.; LEON, L.P. Constituintes químicos e atividade leishmanicida de *Gustavia elliptica* (Lecythidaceae). **Quim Nova.**, v. 34, n. 7, p. 1182-1187, 2011.

ALMEIDA, M.M.B.; ARRIAGA, A.M.C.; SANTOS, A.K.L.; LEMOS, T.L.G.; BRAZ-FILHO, R.; VIEIRA, I.J.C. Ocorrência e atividade biológica de quassinóides da última década. **Quim Nova.**, v. 30, n. 4, p. 935-951, 2007.

ALMEIDA, M.T.R.; LUCI, C.R.; PADRÓN, J.M.; PALERMO, J.A. Antiproliferative terpenoids and alkaloids from the roots of *Maytenus vitis-idaea* and *Maytenus spinosa*. **Phytochemistry.**, v. 71, n. 14-15, p. 1741-1748, 2010.

ALVARENGA, N.; FERRO, E.A. Bioactive triterpenes and related compounds from Celastraceae. **Stud Nat Prod Chem.**, v. 30, p. 635-702, 2006.

AMARANTE, C.B.; MÜLLER, A.H.; PÓVOA, M.M.; DOLABELA, M.F. Estudo fitoquímico biomonitorado pelos ensaios de toxicidade frente à *Artemia salina* e de atividade antiplasmódica do caule de aninga (*Montrichardia linifera*). **Acta Amaz.**, v. 41, n. 3, p. 431-434, 2011.

AMORIM, C.Z.; FLORES, C.A.; GOMES, B.E.; MARQUES, A.D.; CORDEIRO, R.S.B. Screening for antimalarial activity in the genus *Pothomorphe*. **J Ethnopharmacol.**, v. 24, n. 1, p. 101-106, 1988.

AMORIM, C.Z.; GOMES, B.E.; FLORES, C.A.; CORDEIRO, R.S.B. Antimalarial activity screening from plants of the genus *Pothomorphe*. **Braz J Med Biol Res.**, v. 19, p. 569A-569A, 1986.

ANDRADE, S.F.; CARDOSO, L.G.; BASTOS, J.K. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of extract, fractions and populnoic acid from bark wood of *Austroplenckia populnea*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 109, n. 3, p. 464-471, 2007.

ANDRADE, S.F.; COMUNELLO, E.; NOLDIN, V.F.; MONACHE, F.D.; CECHINEL-FILHO, V.; NIERO, R. Antiulcerogenic activity of fractions and 3,15-dioxo-21_h-hydroxy friedelane isolated from *Maytenus robusta* (Celastraceae). **Arch Pharm Res.**, v. 31, n.1, p. 41-46, 2008.

- ANDRADE, S.F.; LEMOS, M.; COMUNELLO, E.; NOLDIN, V.F.; CECHINEL-FILHO, V.; NIERO, R. Evaluation of the antiulcerogenic activity of *Maytenus robusta* (Celastraceae) in different experimental ulcer models. **J Ethnopharmacol.**, v. 113, n.2, p. 252-7, 2007.
- ANDRADE-NETO, V.F.; BRANDÃO, M.G.; STEHMANN, J.R.; OLIVEIRA, L.A.; KRETTLI, A.U. Antimalarial activity of *Cinchona-like* plants used to treat fever and malaria in Brazil. **J Ethnopharmacol.**, v. 87, n. 2-3, p. 253-256, 2003.
- ANDRADE-NETO, V.F. ; POHLIT, A.M. ; PINTO, A.C.S. ; SILVA, E.C.C. ; NOGUEIRA, K.L. ; MELO, M.R.S. ; HENRIQUE, M.C. ; AMORIM, R.C.N. ; SILVA, L.F.R. ; COSTA, M.R.F. ; NUNOMURA, R.C.S. ; NUNOMURA, S.M. ; ALECRIM, W.D. ; VIEIRA, P.P.R. *In vitro* inhibition of *Plasmodium falciparum* by substances isolated from Amazonian antimalarial plants. **Mem Inst Oswaldo Cruz.**, v. 102, n.3, p. 359-365, 2007.
- ANGELI, J.P.F.I.; BARCELOS, G.R.M.I.; SERPELONI, J.M.; BARBOSA JUNIOR, F.I.; NERSESYAN, A.; MANTOVANI, M.S. Evaluation of the genotoxic activities of silybin in human hepatoma cells (HepG2). **Mutagenesis.**, v.25, n.3, p.223-229, 2010.
- ANGIONI, A.; BARRA, A.; ARLORIO, M.; COISSON, J.D.; RUSSO, M.T.; PIRISI, F.M.; SATTA, M.; CABRAS, P. Chemical composition, plant genetic differences, and antifungal activity of the essential oil of *Helichrysum italicum* G. Don ssp. *microphyllum* (Willd.) Nym. **J Agric Food Chem.**, v. 51, n. 4, p. 1030-1034, 2003.
- ANTONISAMY, P.; DURAI PANDIYAN, V.; IGNACIMUTHU, S. Anti-inflammatory, analgesic and antipyretic effects of friedelin isolated from *Azima tetraacantha* Lam. in mouse and rat models. **J Pharm Pharmacol** v. 63, n. 8, p. 1070-1077, 2011.
- APERS, S.; CIMANGA, K.; VANDEN BERGHE, D.; VAN MEENEN, E.; LONGANGA, A.O.; FORIERS, A.; VLIETINCK, A.; PIETERS, L. Antiviral activity of simalikalactone D, a quassinoid from *Quassia africana*. **Planta Med.**, v. 68, n. 1, p. 20-24, 2002.
- ARAÚJO-JR, J.X.; ANTHEAUME, C.; TRINDADE, R.C.P.; SCHMITT, M.; BOURGUIGNON, J.J.; SANT'ANA, A.E.G. Isolation and characterisation of the monoterpenoid indole alkaloids of *Aspidosperma pyrifolium*. **Phytochem Rev.**, v.6, n.1, p.183-188, 2007.
- ARENAS, P.; AZORERO, R.M. Plants of common use in Paraguayan folk medicine for regulating fertility. **Econ Bot.**, v. 31, n.3, p. 298-301, 1977.
- BAGATINI, M.D.; SILVA, A.C.F.; TEDESCO, S.B. Uso do sistema de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. **Rev Bras Farmacogn.**, v. 17, n. 3, p. 444-447, 2007.
- BARBOSA, W.L.R.; TAVARES, I.C.C.; SOARES, D.C. Alcalóides de *Aspidosperma auriculatum* Standl. **Braz J Pharmacogn.**, v. 13, supl.1, p. 6-8, 2003.
- BARRERA, P.; SÜLSEN, V.P.; LOZANO, E.; RIVERA, M.; BEER, M.F.; TONN, C.; MARTINO, V.S.; SOSA, M.A. Natural Sesquiterpene Lactones Induce Oxidative Stress in *Leishmania mexicana*. **Evid Based Complement Alternat Med.**, v. 2013, p. 163404, 2013.
- BARROS, N.B.; MIGLIACCIO, V.; FACUNDO, V.A.; CIANCAGLINI, P.; STÁBELI, R.G.; NICOLETE, R.; SILVA-JARDIM, I. Liposomal-lupane system as alternative chemotherapy against cutaneous leishmaniasis: macrophage as target cell. **Exp Parasitol.**, v. 135, n. 2, p.337-343, 2013.
- BASCO, L.K.; MITAKU, S.; SKALTSOUNIS, A.L.; RAVELOMANANTSOA, N.; TILLEQUIN, F.; KOCH, M.; LE BRAS, J. *In vitro* activities of furoquinoline and acridone

- alkaloids against *Plasmodium falciparum*. **Antimicrob Agents Ch.**, v. 38, n. 5, p. 1169-1171, 1994.
- BAUDOIN, G.; TILLEQUIN, F.; KOCH, M.; DAU, M.T.H.; GUILHEM, J.; JACQUEMIN, H. Two new sesquiterpene-ester alkaloids from *Maytenus myrsinoides* Reiss. (Celastraceae). **Heterocycles.**, v. 22, n. 10, p. 2221-2226, 1984.
- BAVOVADA, R.; BLASKÓ, G.; SHIEH, H.L.; PEZZUTO, J.M.; CORDELL, G.A. Spectral assignment and cytotoxicity of 22-hydroxytingenone from *Glyptopetalum sclerocarpum*. **Planta Med.**, v. 56, n. 4, p. 380-382, 1990.
- BEGUM, S.; AYUB, A.; QAMAR ZEHRA, S.; SHAHEEN SIDDIQUI, B.; IQBAL CHOUDHARY, M.S. Leishmanicidal triterpenes from *Lantana camara*. **Chem Biodivers.**, v. 11, n. 5, p. 709-18, 2014.
- BERNAL, F.A.; COY-BARRERA, E. In-Silico Analyses of Sesquiterpene-Related Compounds on Selected Leishmania Enzyme-Based Targets. **Molecules.**, v. 19, n. 5, p. 5550-5569, 2014.
- BERG, M.E.V.D. **Plantas medicinais na Amazônia: contribuição ao seu conhecimento sistemático**. 2ª ed, Museu Paraense Emílio Goeldi, 2010.
- BERTANI, S.; HOUËL, E.; STIEN, D.; CHEVOLOT, L.; JULLIAN, V.; GARAVITO, G.; BOURDY, G.; DEHARO, E. Simalikalactone D is responsible for the antimalarial properties of an Amazonian traditional remedy made with *Quassia amara* L. (Simaroubaceae). **J Ethnopharmacol.**, v. 108, n.1, p. 155-157, 2006.
- BESSEMS, J.G.; GAISSER, H.D.; TE KOPPELE, J.M.; VAN BENNEKOM, W.P.; COMMANDEUR, J.N.; VERMEULEN, N.P. 3,5-Disubstituted analogues of paracetamol. Synthesis, analgesic activity and cytotoxicity. **Chem Biol Interact.**, v. 98, n. 3, p. 237-250, 1995.
- BETACOR, C., FREIRE, R., GONZALES, A.G., SALAZAR, J.A., PASCARD, C., PRANGE, T. Three triterpenes and other terpenoids from *Catha cassinoides*. **Phytochemistry.**, v. 19, n.9, 1989-1993, 1980
- BEZERRA, R.J.S.; LEON, L.; GENESTRA, M. Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármacos. **Rev Bras Ciênc Farm.**, v. 40, n. 2, 141-148, 2004.
- BEZERA, W. S.; MENEGUETTI, D. U. O.; CAMARGO, L. M. A. A busca de fármacos para tratamento da Tripanossomíase Americana: 103 anos de negligência. **Saúde.**, v. 38, n. 1, p. 09-20, 2012.
- BÉZIVIN, C.; TOMASI, S.; LOHÉZIC-LE, F.D.; BOUSTIE, J. Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer cell lines. **Phytomedicine.**, v. 10, n. 6-7, p.499-503, 2003.
- BLOCK, S.; BACCELLI, C.; TINANT, B.; VAN MEERVELT, L.; ROZENBERG, R.; HABIB JIWAN, J.L.; LLABRÈS, G.; DE PAUW-GILLET, M.C.; QUETIN-LECLERCQ, J. Diterpenes from the leaves of *Croton zambesicus*. **Phytochemistry.**, v. 65, n.8, p. 1165-1171, 2004.
- BODE, A.M.; DONG, Z. Toxic phytochemicals and their potential risks for human cancer. **Cancer Prev Res.**, v. 8, n. 1, 1-8, 2014.
- BOGDAN, C.; MOLL, H.; SOLBACH, W.; RÖLLINGHOFF, M. Tumor necrosis factor- α in combination with interferon- γ , but not with interleukin 4 activates murine macrophages for

elimination of *Leishmania major* amastigotes. **Eur J Immunol.**, v. 20, n. 5, p. 1131-1135, 1990.

BORGES, C.C.; MATOS, T.F.; MOREIRA, J.; ROSSATO, A.E.; ZANETTE, V.C.; AMARAL, P.A. *Bidens pilosa* L. (Asteraceae): traditional use in a community of southern Brazil. **Rev Bras Plantas Med.**, v. 15, n. 1, p. 34-40, 2013.

BORRÁS, M.R.L. **Plantas da Amazônia: medicinais ou mágicas - plantas comercializadas no Mercado Municipal Adolpho Lisboa.** Governo do Estado do Amazonas, Manaus, 2003.

BOU, D.D.; TEMPONE, A.G.; PINTO, E.G.; LAGO, J.H.; SARTORELLI, P. Antiparasitic activity and effect of casearins isolated from *Casearia sylvestris* on *Leishmania* and *Trypanosoma cruzi* plasma membrane. **Phytomedicine.**, v. 21, n. 5, p. 676-681, 2014.

BRAGA, F.G.; BOUZADA, M.L.; FABRI, R.L.; MATOS, M.O.; MOREIRA, F.O.; SCIO, E.; COIMBRA E.S. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. **J Ethnopharmacol.**, v. 111, n.2, p. 396-402, 2007.

BRANDÃO, M.G.L.; GRANDI, T.S.M.; ROCHA, E.M.M.; SAWYER, D.R.; KRETTLI, A.U. Survey of medicinal plants used as antimalarials in the Amazon. **J Ethnopharmacol.**, v. 36, n. 2, p. 175-182, 1992.

BRANDÃO, M.G.L.; KRETTLI, A.U.; SOARES, L.S.R.; NERY, C.G.C.; MARINUZZI, H.C. Antimalarial activity of extracts and fractions from *Bidens pilosa* and other *Bidens species* (Asteraceae) correlated with the presence of acetylene and flavonoid compounds. **J Ethnopharmacol.**, v. 57, n. 2, p.131-138, 1997.

BRONIATOWSKI, M.; FLASIŃSKI, M.; WYDRO, P. Investigation of the interactions of lupane type pentacyclic triterpenes with outer leaflet membrane phospholipids–Langmuir monolayer and synchrotron X-ray scattering study. **J Colloid Interface Sci.**, v. 381, n. 1, 116-124, 2012.

BRUNI, R.; ROSSI, D.; MUZZOLI, M.; ROMAGNOLI, C.; PAGANETTO, G.; BESCO, E.; Choquecillo, F.; Peralta, K.; Lora, W.S.; Sacchetti, G. Antimutagenic, antioxidant and antimicrobial properties of *Maytenus krukovii* bark. **Fitoterapia.**, v. 77, n.7-8, p. 538-545, 2006.

BUFFA-FILHO, W.; CORSINO, J.; BOLZANI, V.S.; FURLAN, M.; PEREIRA, A.M.S.; FRANCA, S.C. Quantitative determination for cytotoxic Friedo-nor-oleanane derivatives from five morphological types of *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae) by reverse-phase high-performance liquid chromatography. **Phytochem Anal.**, v. 13, n. 2, p. 75-78, 2002

CABRAL, J.A.; MCCHESENEY, J.D.; MILHOUS, W.K. A new antimalarial quassinoid from *Simaba guianensis*. **J Nat Prod.**, v. 56, n. 11, p. 1954-1961, 1993.

CABRAL, M.A. **Anotações em farmacologia e farmácia clínica.** Disponível em <http://farmacolog.dominiotemporario.com/doc/Anotacoes_em_Farmacologia.pdf>.

Acessado em 01/10/2013.

CALDERON, L.A.; SILVA-JARDIM, I.; ZULIANI, J.P.; SILVA, A.A.; CIANCAGLINI, P.; PEREIRA DA SILVA, L.H.; STÁBELI, R.G. Amazonian biodiversity: a view of drug development for Leishmaniasis and Malaria. **J Braz Chem Soc.**, v. 20, n.6, p. 1011-1023, 2009.

- CALVO-CALLE, J.; MORENO, A.; ELING, W.; NARDIN, E. In vitro development of infectious liver stages of *P. yoelii* and *P. berghei* malaria in human cell lines. **Exp Parasitol.**, v. 79, n. 3, p. 362-373, 1994.
- CAMPAROTO, M.L.; TEIXEIRA, R.O.; MANTOVANI, M.S.; VICENTINI, V.E.P. Effects of *Maytenus ilicifolia* Mart. and *Bauhinia candicans* Benth infusions on onion root-tip and rat bone-marrow cells. **Genet Mol Biol.**, v. 25, n. 1, p. 85-89, 2002.
- CARLINI, E.A.; FROCHTENGARTEN, M.L. **Toxicologia clínica (Fase I) da espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*)**. Brasília, Distrito Federal, 1988.
- CARVALHO, P.E.R. Cafezeiro-do-Mato *Casearia sylvestris*. **Circular Técnica Embrapa.**, v. 138, p. 1-16, 2007.
- CARVALHO, P.R.F.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S.; FURLAN, M. Antioxidant Quinonemethide Triterpenes from *Salacia campestris*. **Chem Biodivers.**, v. 2, n. 3, 367-372, 2005.
- CARVALHO-OKANO, R.M.; LEITÃO-FILHO, H.F. **O gênero *Maytenus* Mol. emend. Mol. (Celastraceae) no Brasil extra-amazônico**. In: REIS, M.S.; SILVA, S.R. Conservação e uso sustentável de plantas medicinais e aromáticas: *Maytenus* spp. Espinheira Santa. Ibama, Brasília, 2004.
- CECHINEL, F.V.; ROSENDO, A.Y. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Quim Nova.**, v. 21, n. 1. p. 99-105, 1998.
- CHAVES, H.; ESTEVES-BRAUM, A.; RAVELO, A. G.; GONZALES, A. G. New phenolic and quinone-methide triterpenes from *Maytenus amazônica*. **J Nat Prod.**, v. 62, n. 3, p. 434-436, 1999.
- CHIERRITO, T.P.C.; AGUIAR, A.C.C.; ANDRADE, I.M.; CERAVOLO, I.P.; GONÇALVES, A.C.R.; OLIVEIRA, A.J.B.; KRETTLI, A.U. Anti-malarial activity of indole alkaloids isolated from *Aspidosperma olivaceum*. **Malar J.**, v. 13, n. 142, p. 1-10, 2014.
- CHOI, C.M.; LERNER, E.A. Leishmaniasis as an emerging infection. **J Investig Dermatol Symp Proc.**, v. 6, n.3, 175-182, 2001.
- COELHO, R.G.; DI STASI, L.C.; VILEGAS, W.Z. Chemical constituents from the infusion of *Zollernia ilicifolia* Vog. and comparison with *Maytenus* species. **Z Naturforsch.**, v. 58, n. 1-2, 47-52, 2003.
- CORDEIRO, P.J.M.; VILEGAS, J.H.Y.; LANÇAS, F.M. HRGC-MS Analysis of Terpenoids from *Maytenus ilicifolia* and *Maytenus aquifolium* ("Espinheira Santa"). **J Braz Chem Soc.**, v. 10, n.6, p. 523-526, 1999.
- CORSINO, J.; BOLZANI, V. S.; PEREIRA, A.M.S.; FRANÇA, S. C.; BURLAN, M. Bioactive sesquiterpene pyridine alkaloids from *Maytenus aquifolium*. **Phytochem.**, v. 48, n. 1, p. 137-140, 1998.
- CORSINO, J.; DE CARVALHO, P.R.; KATO, M.J.; LATORRE, L.R.; OLIVEIRA, O.M.M.F.; ARAUJO, A.R.; BOLZANI, V.S.; FRANCA, S.C.; PEREIRA, A.M.S.; FURLAN, M. Biosynthesis of friedelane and quinonemethide triterpenoids is compartmentalized in *Maytenus aquifolium* and *Salacia campestris*. **Phytochem.**, v. 55, n. 7, p. 741-748, 2000.

- CORSINO, J.; SILVA, D.H.S.; ZANONI, M.V.B.; BOLZANI, V.S.; FRANÇA, S.C.; PEREIRA, A.M.S.; FURLAN, M. Antioxidant Flavan-3-ols and Flavonol Glycosides from *Maytenus aquifolium*. **Phytother Res**, v. 17, n.8, p. 913–916, 2003.
- COSTA, E.V.; PINHEIRO, M.L.B.; SILVA, J.R.A.; MAIA, B.H.L.N.S.; DUARTE, M.C.T.; AMARAL, A.C.F.; MACHADO, G.M.C.; LEON, L.L. Antimicrobial and antileishmanial activity of essential oil from the leaves of *Annona foetida* (Annonaceae). **Quim Nova.**, v. 32, n. 1, p. 78-81, 2009b.
- COSTA, E.V.; PINHEIRO, M.L.B.; XAVIER, C.M.; SILVA, J.R.A.; AMARAL, A.C.F.; SOUZA, A.D.L.; BARISON, A.; CAMPOS, F.R.; FERREIRA, A.G.; MACHADO, G.M.; LEON, L.L. A pyrimidine-beta-carboline and other alkaloids from *Annona foetida* with antileishmanial activity. **J Nat Prod.**, v. 69, n.2, p. 292-294, 2006.
- COSTA, E.S.S.; DOLABELA, M.F.; PÓVOA, M.; OLIVEIRA, D.J.; MÜLLER, A.H. Estudos farmacognósticos, fitoquímicos, atividade antiplasmódica e toxicidade em *Artemia salina* de extrato etanólico de folhas de *Montrichardia linifera* (Arruda) Schott, Araceae. **Rev Bras Farmacogn.**, v. 9, n. 4, p. 834-838. 2009a.
- COUTINHO, J.P.; AGUIAR, A.C.; SANTOS, P.A.; LIMA, J.C.; ROCHA, M.G.; ZANI, C.L.; ALVES, T.M.; SANTANA, A.E.; PEREIRA, M.M.; KRETTLI, A.U1. *Aspidosperma* (Apocynaceae) plant cytotoxicity and activity towards malaria parasites. Part I: *Aspidosperma nitidum* (Benth) used as a remedy to treat fever and malaria in the Amazon. **Mem Inst Oswaldo Cruz.**, v. 108, n. 8, p. 974-982, 2013.
- CRUZ, E.M.; SILVA, E.R.; MAQUIAVELI, C.C.; ALVES, E.S.; LUCON, J.F.; REIS, M.B.; DE TOLEDO, C.E.; CRUZ, F.G.; VANNIER-SANTOS, M.A. Leishmanicidal activity of *Cecropia pachystachya* flavonoids: arginase inhibition and altered mitochondrial DNA arrangement. **Phytochemistry.**, v. 89, p. 71-77, 2013.
- CUNHA-FILHO, G.A.; RESCK, I.S.; CAVALCANTI, B.C.; PESSOA, C.O.; MORAES, M.O.; FERREIRA, J.R.; RODRIGUES, F.A.; DOS SANTOS, M.L. Cytotoxic profile of natural and some modified bufadienolides from toad *Rhinella schneideri* parotoid gland secretion. **Toxicon.**, 56, n.3, p. 339-348, 2010.
- DANELLI, M.G.; SOARES, D.C.; ABREU, H.S.; PEÇANHA, L.M.; SARAIVA, E.M. Leishmanicidal effect of LLD-3 (1), a nor-triterpene isolated from *Lophanthera lactescens*. **Phytochemistry.**, v. 70, n. 5. p. 608-614, 2009.
- DA SILVA, M.S.; SOUSA, D.P.; MEDEIROS, V.M.; FOLLY, M.A.B.; TAVARES, J.F.; BARBOSAFILHO, J. Alkaloid, flavonoids, and pentacyclic triterpenoids of *Maytenus obtusifolia* Mart. **Biochem Syst Ecol.**, v. 36, n. 5, p. 500-503, 2008.
- DELGADO-MÉNDEZ, P.; HERRERA, N.; CHÁVEZ, H.; ESTÉVEZ-BRAUN, A.; RAVELO, A. G.; CORTES, F.; CASTANYS, S.; GAMARRO, F. New terpenoids from *Maytenus apurimacensis* as MDR reversal agents in the parasite *Leishmania*. **Bioorg Med Chem.**, v. 16, n. 3, p. 1425-1430, 2008.
- DE OLIVEIRA, D.M.; SILVA G.D.F.; DUARTE, L.P.; FILHO, S.A.V. Chemical constituents isolated from roots of *Maytenus acantophylla* Reissek (Celastraceae). **Biochem Syst Ecol.**, v. 34, n. 8, p. 661-665, 2006.
- DE SOUSA, J.R.; PINHEIRO, J.A.; RIBEIRO, E.F.; SOUZA, E.; MAIA, J. G.S. A sesquiterpene evoninoate alkaloid from *Maytenus guianensis*. **Phytochem.**, v. 25, n. 7, p. 1776-1778, 1986.

DE-PAULA, R.C.; DOLABELA, M.F.; DE-OLIVEIRA, A.B. Aspidosperma Species as Sources of Antimalarials. Part III. A Review of Traditional Use and Antimalarial Activity. **Planta Med.**, v. 80, n. 5, p. 378-86, 2014.

DIAS, K.S.; MARQUES, M.S.; MENEZES, I.A.C.; SANTOS, T.C.; SILVA, A.B.L.; ESTEVAM, C.S.; SANT'ANA, A.E.G.; PIZZA, C.; ANTONIOLLI, A.R.; MARCAL, R. M. Antinociceptive activity of *Maytenus rigida* stem bark. **Fitoterapia.**, v. 78, n. 7-8, p. 460-464, 2007.

DIAS, L.C.; DESSOY, M.A. Quimioterapia da doença de chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. **Quím Nova.**, v. 32, n. 9, p. 2444-2457, 2009.

DIAS, M.O.; HAMERSKI, L.; PINTO, A.C. Separação semipreparativa de α e β -amirina por cromatografia líquida de alta eficiência. **Quím Nova.**, v. 34, n. 4, p. 704-706, 2011.

DING, Y.; LIANG, C.; KIM, J. H.; LEE, Y. M.; HYUN, J. H.; KANG, H. K.; KIM, J. A.; MIN, B. S.; KIM, Y. H. Triterpene compounds isolated from *Acer mandshuricum* and their anti-inflammatory activity. **Bioorg Med Chem Lett.**, v. 20, n. 5, p. 1528-1531, 2010.

DI-STASI, L.C. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2ª ed. Unesp, 2002.

DOLABELA, M.F.; OLIVEIRA, S.G.; NASCIMENTO, J.M.; PERES, J.M.; WAGNER, H.; PÓVOA, M.M.; DE OLIVEIRA, A.B. *In vitro* antiplasmodial activity of extract and constituents from *Esenbeckia febrifuga*, a plant traditionally used to treat malaria in the Brazilian Amazon. **Phytomedicine.**, v. 15, n. 5, p. 367-372, 2008.

DOLABELA MF. **Atividade antiplasmódica e citotoxicidade de *Esenbeckia febrifuga* (A.ST-HIL) Juss. ex Mart. (Rutaceae) e de espécies do gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae)**. (Tese) Doutorado Ciências Farmacêuticas - Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil, 2007.

DOMINGO, V.; ARTEAGA, J.F.; MORAL, J.F.Q.; BARRERO, A.F. Unusually cyclized triterpenes: occurrence, biosynthesis and chemical synthesis. **Nat Prod Rep.**, v. 26, n. 1, p. 115-134, 2009.

DUARTE, L.P.; FIGUEIREDO, R.C.; DE SOUZA, G.F.; SOARES, D.B.S.; RODRIGUES, S.B.V.; SILVA, F.C; SILVA, G.D.F.; VIEIRA FILHO, S.A. Chemical constituents of *Salacia elliptica* (Celastraceae). **Química Nova.**, v. 33, n. 4, p. 900-903, 2010.

DUARTE, L.P.; MIRANDA, R.R.S.; RODRIGUES, S.B.V.; SILVA, G.D.F.; VIEIRA-FILHO, S.A.; KNUPP, V.F. Stereochemistry of 16a-Hydroxyfriedelin and 3-Oxo-16-methylfriedel-16-ene Established by 2D NMR Spectroscopy. **Molecules.**, v.14, n. 2, p. 598-607, 2009.

DUARTE, L.P.; VIEIRA FILHO, S.A.; SILVA, G.D.F.; SOUSA, J.R.; PINTO, A.S. Anti-trypanosomal activity of pentacyclic triterpenes isolated from *Austroplenckia populnea* (Celastraceae). **Rev Inst Med Trop São Paulo.**, v. 44, n. 2, p. 109-112, 2002.

DUARTE, M.C.; TAVARES, J.F.; MADEIRO, S.A.; COSTA, V.C.O.; BARBOSA-FILHO, J.M.; AGRA, M.F.; BRAZ-FILHO, R.; SILVA, M.S. Maytensifolone, a new triterpene from *Maytenus distichophylla* Mart. ex Reissek. **J Braz Chem Soc.**, v. 24, n. 10, p. 1697-1700, 2013.

DÜSMAN, E.; BERTI, A. P.; SOARES, L. C.; VICENTINI, V. E. P. Principais Agentes Mutagênicos e Carcinogênicos de Exposição Humana. **Rev Saúde Biol**, v. 7, n. 2, p. 66-81, 2012.

DUSZENKO, M.; GINGER, M.L.; BRENNAND, A.; GUALDRÓN-LÓPEZ, M.; COLOMBO, M.I.; COOMBS, G.H.; COPPENS, I.; JAYABALASINGHAM, B.; LANGSLEY, G.; DE CASTRO, S.L.; MENNA-BARRETO, R.; MOTTRAM, J.C.; NAVARRO, M.; RIGDEN, D.J.; ROMANO, P.S.; STOKA, V.; TURK, B.; MICHELS, P.A. Autophagy in protists. **Autophagy**, v. 7, n. 2, p. 127-158, 2011.

DUTRA, M.G. **Plantas medicinais, fitoterápicos e saúde pública: um diagnóstico situacional em Anápolis, Goiás.** (Dissertação) Mestrado em Sociedade, Tecnologia e Meio Ambiente - Centro Universitário de Anápolis, Anápolis, Goiás, 2009.

ENDRESS, M.E.; BRUYNS, P.V. A revised classification of the Apocynaceae S.L. **The Bot Rev.**, v. 66, n. 1, p. 1-46. 2000.

ESPINDOLA, L.S.; VASCONCELOS JÚNIOR, J.R.; DE MESQUITA, M.L.; MARQUIÉ, P.; DE PAULA, J.E.; MAMBU, L.; SANTANA, J.M. Trypanocidal activity of a new diterpene from *Casearia sylvestris* Var. Lingua. **Planta Med.**, v. 70, n. 11, p. 1093-1095, 2004.

FACUNDO, V.A.; MENEGUETTI, D.U.O.; MILITÃO, J.S.L.T.; LIMA, R.A.; HURTADO, F.B.; CASSEB, A.A.; TEIXEIRA, L.F.; SILVA, I.C.; SILVA, G.V.J.; LACERDA JUNIOR, V. Chemical Constituents from *Maytenus guianensis* Klotzsch ex Reissek (Celastraceae) Amazon Rainforest. **Biochem Syst Ecol.**, v. 58, p. 270-273, 2015.

FACUNDO, V.A., POLLI, A.R., RODRIGUES, R.V., MILITÃO, J.S.L.T., STABELLI, R.G., CARDOSO, C.T. Constituintes químicos fixos e voláteis dos talos e frutos de *Piper tuberculatum* Jacq. e das raízes de *P. hispidum* H. B. K. **Acta Amaz.**, v. 38, n. 4, p. 733-742, 2008.

FANDEUR, T.; MORETTI, C.; POLONSKY, J. *In vitro* and *in vivo* assessment of the antimalarial activity of sergeolide. **Planta Med.**, v. 51, p. 20-23, 1985.

FÃO, F.; ZAN, R. A.; BRONDANI, F. M. M.; RAMOS, L. J.; MENEGUETTI, D. U. O. Análise do potencial mutagênico da seiva da casca de *Croton lechleri* (Müll. Arg), no Estado de Rondônia, Amazônia Ocidental. **Rev Saúde e Biol**, v. 7, n. 1, p. 91-98, 2012.

FERREIRA, I.C.P.; LONARDONI, M.V.C.; MACHADO, G.M.C.; LEON, L.L.; FILHO, L.G.; PINTO, L.H.B.; OLIVEIRA, A.J.B. Anti-leishmanial activity of alkaloidal extract from *Aspidosperma ramiflorum*. **Mem Inst Oswaldo Cruz.**, v. 99, n. 3, p. 325-327, 2004.

FERREIRA, M.G.P.R.; KAYANO, A.M.; SILVA-JARDIM, I.; SILVA, T.O.; ZULIANI, J.P.; FACUNDO, V.A.; CALDERON, L.A.; SILVA, A.A.; CIANCAGLINI, P.; STÁBELI, R.G. Antileishmanial activity of 3-(3,4,5-trimethoxyphenyl) propanoic acid purified from Amazonian *Piper tuberculatum* Jacq. (Piperaceae) fruit. **Rev Bras Farmacogn.**, v. 20, n. 6, p. 1003-1006, 2010.

FERREIRA, P.M.P.; COSTA-LOTUFO, L.V.; MORAES, M.O.; BARROS, F.W.A.; MARTINS, A.M.A.; CAVALHEIRO, A.J.; BOLZANI, V.S.; SANTOS, A.G.; PESSOA, C. Folk uses and pharmacological properties of *Casearia sylvestris*: a medicinal review. **An Acad Bras Cienc.**, v. 83, n. 4, 1373-1384, 2011.

FERREIRA, D.S.; ESPERANDIM, V.R.; MARÇAL, M.G.; NERES, N.B.R.; CUNHA, N.L.; ANDRADE, M.L.; SILVA, W.R.C. Natural products and Chagas' disease: the action of triterpenes acids isolated from Miconiaspecies. **Univ Sci Vol**, v. 18, n. 3, 243-256, 2013.

FISKESJÖ, G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas.**, v. 102, n.1, p. 99-112, 1985.

- FISKESJO, G. The *Allium* Test II: Assesmente of chemical's genotoxic potential by recording aberrations in chromosomes and cell divisions in root tips of *Allium cepa* L. **Environ Toxicol Water Qual.**, v. 9, n. 3, p. 234-241, 1994.
- FIVELMAN, Q.L.; ADAGU, I.S.; WARHURST, D.C. Modified fixed-ratio isobologram method for studying *in vitro* interactions between atovaquone and proguanil or dihydroartemisinin against drug-resistant strains of *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother.*, v. 48, n. 11, p. 4097-4102, 2004.
- FLORES, N.; JIMÉNEZ, I.A.; GIMÉNEZ, A.; RUIZ, G.; GUTIÉRREZ, D.; BOURDY, G.; BAZZOCCHI, I.L. Benzoic acid derivatives from Piper species and their antiparasitic activity. **J Nat Prod.**, v. 71, n. 9, p. 1538-1543, 2008.
- FONSECA, A.P.N.D.; SILVA, G.D.F.; CARVALHO, J.J.C.; SALAZAR, G.D.C.M.; DUARTE, L.P.; SILVA, R.P.; TAGLIATI, C.A.; ZANI, C.L.; NEVES, T.M.A.; PERES, V.; VIEIRA-FILHO, S.A. Estudo fitoquímico do decocto das folhas de *Maytenus truncata* Reissek e avaliação das atividades antinociceptiva, antiedematogênica e antiulcerogênica de extratos do decocto. **Quím Nova.**, v. 30, n. 4, p. 842-847, 2007.
- FORMIGONI, M. L. O. S.; OLIVERIA, M. G. M.; MONTEIRO, M. G.; SILVEIRA-FILHO, N. G.; BRAZ, S.; CARLINI, E. A. Antiulcerogenic effects of two *Maytenus* species in laboratory animals. **J Ethnopharmacol.**, v. 34, p. 21-27, 1991.
- FOURNET, A.; ANGELO, A.; MUNOZ, V.; ROBLLOT, F.; HOCQUEMILLER, R.; CAVÉ, A. Biological and chemical studies of *Pera benensis*, a Bolivian plant used in folk medicine as a treatment of cutaneous leishmaniasis. **J Ethnopharmacol.**, v. 37, n. 2, p. 159-164, 1992a.
- FOURNET, A.; BARRIOS, A.A.; MUNOZ, V.; HOCQUEMILLER, R.; CAVÉ, A. Effect of natural naphthoquinones in BALB/c mice infected with *Leishmania amazonensis* and *L. venezuelensis*. **Trop Med Parasitol.**, v. 43, n.4, p. 219-222, 1992b.
- FRANÇA, T.C.C.; SANTOS, M.G.; FIGUEROA-VILLAR, J.D. Malária: aspectos históricos e quimioterapia. **Quím Nova.**, v. 31, n. 5, p. 1271-1278, 2008.
- FRITIS, M.C.; LAGOS, C.R.; SOBARZO, N.Q.; VENEGAS, I.M.; SÁNCHEZ, C.S.; ALTAMIRANO, H.C.; CATALÁN, L.E.; PALMA, W.Q. Depsides and triterpenes in *Pseudocyphellaria coriifolia* (lichens) and biological activity against *Trypanosoma cruzi*. **Nat Prod Res.**, v. 27, n. 17, p. 1607-1610, 2013.
- GANATRA, S. H.; SUCHAK, A.S. Inhibition Studies of Naturally Occurring Terpene based Compounds with Cyclin-Dependent Kinase 2 Enzyme. **J Comput Sci Syst Biol.**, v. 5, n. 2, p. 68-73, 2012.
- GARCÍA, M.; MONZOTE, L.; MONTALVO, A.M.; SCULL, R. Screening of medicinal plants against *Leishmania amazonensis*. *Pharm Biol.*, v. 48, n.9, 1053-1058, 2010.
- GARDNER, M.J.; HALL, N.; FUNG, E.; WHITE, O.; BERRIMAN, M.; HYMAN, R.W.; CARLTON, J.M.; PAIN, A.; NELSON, K.E.; BOWMAN, S.; PAULSEN, I.T.; JAMES, K.; EISEN, J.A.; RUTHERFORD, K.; SALZBERG, S.L.; CRAIG, A.; KYES, S.; CHAN, M.S.; NENE, V.; SHALLOM, S.J.; SUH, B.; PETERSON, J.; ANGIUOLI, S.; PERTEA, M.; ALLEN, J.; SELENGUT, J.; HAFT, D.; MATHER, M.W.; VAIDYA, A.B.; MARTIN, D.M.; FAIRLAMB, A.H.; FRAUNHOLZ, M.J.; ROOS, D.S.; RALPH, S.A.; MCFADDEN, G.I.; CUMMINGS, L.M.; SUBRAMANIAN, G.M.; MUNGALL, C.; VENTER, J.C.; CARUCCI, D.J.; HOFFMAN, S.L.; NEWBOLD, C.; DAVIS, R.W.; FRASER, C.M.; BARRELL, B. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Nature.**, v. 419, n. 6906, p. 498-511, 2002.

- GERSHENZON, J.; DUDAREVA, N. The function of terpene natural products in the natural world. **Nat Chem Biol.**, v. 3, n. 7, p. 408-414, 2007.
- GOIJMAN, S.G.; TURRENS, J.F.; MARINI-BETTOLO, G.B.; STOPPANI, A.O. Effect of tingenone, a quinonoid triterpene, on growth and macromolecule biosynthesis in *Trypanosoma cruzi*. **Experientia.**, v. 41, n. 5, p. 646-8, 1985.
- GOMES, A.P.; VITORINO, R.R.; COSTA, A.P.; MENDONÇA, E.G.; OLIVEIRA, M.G.A.; SIQUEIRA-BATISTA, R. Malária grave por *Plasmodium falciparum*. **Rev Bras Ter Intensiva.**, v. 23, n. 3, p. 358-369, 2011.
- GONZADO, M.R.J.; ESPADAS, A.R.P.; PUC, R.E.M.; RIVERA, R.B.C.; DIAZ, B.I.A.J.; QUIJANO, L. J. Antigiardial activity of triterpenoids from root bark of *Hippocratea excelsa*. **Nat Prod.**, v. 70, n. 5, p. 863-865, 2007.
- GONZÁLEZ, A.G.; ALVARENGA, N.L.; RAVELO, A.G.; BAZZOCCHI, I.L.; FERRO, E.A.; NAVARRO, A.G.; MOUJIR, L.M. Scutione, a new bioactive norquinonemethide triterpene from *Maytenus scutiodes* (Celastraceae). **Bioorg Med Chem.**, v. 4, n. 6, p. 815-820, 1996.
- GONZALES, A.G.; LOPES, I.; FERRO, E.A.; RAVELO, A.G.; GUTIERREZ, J.; AGUIAR, M.A. Taxonomy and chemotaxonomy of some species of celastraceae. **Biochem Syst Ecol.**, v. 14, n. 5, p. 479-480, 1986.
- GONZALEZ, J.G.; DELLE MONACHE, G.; DELLE MONACHE, F.; MARINI-BETTOLO, G.B. Chuchuhuasha - a drug used in folk medicine in the Amazonian and Andean areas. A chemical study of *Maytenus laevis*. **J Ethnopharmacol.**, v. 5, n. 1, p. 73-77, 1982.
- GONZÁLEZ, A.G.; TINCUSI, B.M.; BAZZOCCHI, I.L.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; KONOSHIMA, T.; JIMÉNEZ, I.A.; RAVELO, A.G. Anti-tumor promoting effects of sesquiterpenes from *Maytenus cuzcoina* (Celastraceae). **Bioorg Med Chem.**, v. 8, n. 7, p. 1773-1778, 2000.
- GOULART, H.R. **Atividade proteolítica do proteossomo em *Plasmodium falciparum* como um possível alvo de drogas antimaláricas.** (Tese) Doutorado em Ciências Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro - Instituto de Ciências Biomédicas (ICB). Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, 2006.
- GUIMARÃES, D.A.S.; FARIA, A.R. Substâncias da natureza com atividade anti-*Trypanosoma cruzi*. **Rev Bras Farmacogn.**, v. 17, n. 3, p. 455-465, 2007.
- GUIMARÃES, E.T.; LIMA, M.S.; SANTOS, L.A.; RIBEIRO, I.M.; TOMASSINI, T.B.; SANTOS, R.R.; DOS SANTOS, W.L.; SOARES, M.B. Activity of physalins purified from *Physalis angulata* in vitro and in vivo models of cutaneous leishmaniasis. **J Antimicrob Chemother.**, v. 64, n.1, p. 84-87, 2009.
- GUIMARÃES, E.T.; LIMA, M.S.; SANTOS, L.A.; RIBEIRO, I.M.; TOMASSINI, T.B.C.; SANTOS, R.R.; SANTOS, W.L.S.; SOARES M.B.P. Effects of seco-steroids purified from *Physalis angulata* L., Solanaceae, on the viability of *Leishmania sp.* **Rev Bras Farmacogn.**, v. 20, n. 6, p. 945-949, 2010.
- GUIMARÃES, L.R.; RODRIGUES, A.P.; MARINHO, P.S.; MULLER, A.H.; GUILHON, G.M.; SANTOS, L.S.; DO NASCIMENTO, J.L.; SILVA, E.O. Activity of the julocrotine, a glutarimide alkaloid from *Croton pullei* var. glabrior, on *Leishmania (L.) amazonensis*. **Parasitol Res.**, v. 107, n. 5, p. 1075-1081, 2010.

GULLO, F.P.; SARDI, J.C.O.; SANTOS, V.A.F.F.M.; SANGALLI-LEITE, F.; PITANGUI, N.S.; ROSSI, S.A.; SILVA, A.C.P.; SOARES, L.A.; SILVA, J.F.; OLIVEIRA, H.C.; FURLAN, M.; SILVA, D.H.; BOLZANI, V.S.; MENDES-GIANNINI, M.J.; FUSCO-ALMEIDA, A.M. Antifungal Activity of Maytenin and Pristimerin. **Evid Based Complement Alternat Med.**, v. 2012, n. 340787, p. 1-6, 2012.

HÉLIO, A.F.; JOÃO, F.J.; ROGER, S. Resistência do *Plasmodium falciparum* ao fansidar, quinina e tetraciclina. **Rev Saúde Pública.**, v. 16, n. 5, p. 299-302, 1982.

HO, C.T.; CHEN, Q.; SHI, H. Antioxidative effects of polyphenol extract prepared from various chinese herbs. **Prev Med.**, v. 21, n. 4, p. 520-525, 1992.

HURTADO, F.B. **Contribuição ao estudo fotoquímico e atividade biológico da entrecasca de *Maytenus guianensis klotzsch ex Reissek* (Celastraceae)**. (Tese) Doutorado em Biologia Experimental - Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, Rondônia, 2013.

ITOKAWA, H.; SHIROTA, O.; MORITA, H.; TAKEYAA, K.; IITAKAB, Y. Sesquiterpene pyridine alkaloids from *Maytenus ebenifolia* Reiss. X-Ray molecular structure of ebenifoline W-1. **J Chem Soc Perkin Trans.**, v. 1, 1247-1254, 1993.

JACOBO-HERRERA, N.J.; BREMNER, P.; MARQUEZ, N.; GUPTA, M.P.; GIBBONS, S.; MUÑOZ, E.; HEINRICH, M. Physalins from *Witheringia solanacea* as modulators of the NF- κ B cascade. **J Nat Prod.**, v. 69, p. 328-231, 2006.

JELLER, A.H.; SILVA, D.H.S.; LIÃO, L.M.; BOLZANI, V.S.; FURLAN, M. Antioxidant phenolic and quinonemethide triterpenes from *Cheiloclinium cognatum*. **Phytochemistry.**, v. 65, n. 13, p. 1977-1982, 2004.

JOFFILY, A.; VIEIRA, R.C. Anatomia foliar de *Maytenus Mol. emend Mol.* (Celastraceae), ocorrente no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Acta Bot Bras.**, v. 19, n. 3, p. 549-561, 2005.

JORGE, R.M.; LEITE, J.P.V.; OLIVEIRA, A.B.; TAGLIATI, C.A. Evaluation of antinociceptive, anti-inflammatory and antiulcerogenic activities of *Maytenus ilicifolia*. **J Ethnopharmacol.**, v. 94, n. 1, p. 93-100, 2004.

KAUFMANN, S.H.; HENGARTNER, M.O. Programmed cell death: alive and well in the new millennium. **Trends Cell Biol.**, v. 11, n. 12, p. 526-534, 2001.

KENNEDY, M.L.; LLANOS, G.G.; CASTANYS, S.; GAMARRO, F.; BAZZOCCHI, I.L.; JIMENEZ, I.A. Terpenoids from *Maytenus* Species and Assessment of Their Reversal Activity against a Multidrug-Resistant *Leishmania tropica* Line. **Chem Biodivers.**, v. 8, n. 12, p. 2291-2298, 2011.

KOMIYA, T.; KYOHKON, M.; OHWAKI, S.; ETO, J.; KATSUZAKI, H.; IMAI, K.; KATAOKA, T.; YOSHIOKA, K.; ISHII, Y.; HIBASAMI, H. Phytol induces programmed cell death in human lymphoid leukemia Molt 4B cells. **Int J Mol Med.**, v. 4, n. 4, p. 377-380, 1999.

KRISHNA, G.; HYASHI, M. *In vivo* rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. **Mut Res.** v. 455, n. 1-2, 155-166, 2000.

KRUL, C.; LUITEN-SCHUITE, A.; TENFELDE, A.; OMMEM, B.; VERHAGEN, H.; HAVENAAR, R. Antimutagenic activity of green tea and black tea extracts studied in a dynamic *in vitro* gastrointestinal model. **Mut Res.**, v. 474, n. 1-2, p. 71-85, 2001.

KUO, P.C.; DAMU, A.G.; LEE, K.H.; WU, T.S. Cytotoxic and antimalarial constituents from roots of *Eurycoma longifolia*. **Bioorg Med Chem.**, v. 12, n. 3, p. 537-544, 2004.

- KUPCHAN, S.M.; KARIM, A. Tumor inhibitors. 114. *Aloe emodin*: antilukemic principle isolated from *Rhamnus frangula* L. **Lloydia.**, v. 39, n. 4, p. 223-224, 1976.
- KVIST, L.P.; CHRISTENSEN, S.B.; RASMUSSEN, H.B.; MEJIA, K.; GONZALEZ, A. Identification and evaluation of Peruvian plants used to treat malaria and leishmaniasis. **J Ethnopharmacol.**, v. 106, n. 3, p. 390-402, 2006.
- LAMBROS, C.; VANDERBERG, J.P. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. **The Journal of Parasitology.**, v. 65, n. 3, p. 418-420, 1979.
- LANG, G.; MAYHUNDIN, N.A.; MITOVA, M.I.; SUN, L.; VAN DER SAR, S.; BLUNT, J.W.; COLE, A.L.J.; ELLIS, G.; LAATSCH, H.; MUNRO, M.H.G. Evolving trends in the dereplication of natural products extracts: New methodology for rapid, small-scale investigation of natural products. **J Nat Prod.**, v. 71, n. 9, p. 1595-1599, 2008.
- LEE, B.W.; SEO, W.D.; GAL, S.W.; YANG, M.S.; PARK, K.H. Quinone Methide Triterpenes from *Tripterygium regelii*. **Agric Chem Biotechnol.**, v. 47, n. 2, 77-80, 2004.
- LEE, M.R.; COLL, JR. Plants against malaria. Part 1: Cinchona or the Peruvian bark. **Physicians Edinb.**, v. 32, n. 3, p. 189-196, 2002.
- LHINHATRAKOOL, T.; PRABPAI, S.; KONGSAEREE, P.; SUTTHIVAIYAKIT, S. Antiplasmodial Sesquiterpene Alkaloids from the Roots of *Maytenus mekongensis*. **J Nat Prod.**, v. 74, n.6, p.1386-1391, 2011.
- LIÃO, L.M. **Alcalóides Sesquiterpênicos piridínicos e triterpenos quinonaméticos degradados de *Salacia campestris* (Hippocrateaceae).** (Tese) Doutorado em Ciências (Química Orgânica) - Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, 1997.
- LIAO, L.M.; SILVA, G.A.; MONTEIRO, M.R.; ALBUQUERQUE, S. Z. Trypanocidal activity of quinonemethide triterpenoids from *Cheiloclinium cognatum* (Hippocrateaceae). **Z Naturforsch C.**, v. 63, n. 3-4, p. 207-210, 2008.
- LIMA, E.R.; MOREIRA, L.S.; FACUNDO, V.A.; SILVA-JARDIM, I.; TELES, C.B.G. Avaliação da bioatividade do extrato etanólico e triterpeno lupano obtidos de *Combretum leprosum* contra microorganismos. **Saber Cient.**, v. 3, n. 1, p. 53-69, 2011.
- LIMA, R.A.; HURTADO, F.B.; SILVA, G.V.J.; MILITÃO, J.S.L.T.; FACUNDO, V.A. Triterpenos friedelanos isolados do eluato hexânico da entrecasca de *Maytenus guianensis* (Celastraceae). **64º Congresso Brasileiro de Botânica**, 2013.
- LIMA, A. P.; LEITE, N. S.; CAMARGO, E. A.; ESTEVAM, C. S.; PANTALEAO, S. M.; FERNANDES, R. P. M.; COSTA, S. K. P.; MUSCARAS, M. N.; THOMAZZI, S. M. Avaliação da atividade cicatrizante do extrato acetônico da casca da *Maytenus rigida* Mart. (Celastraceae). **Scientia Plena**, v. 6, n. 3, p. 1-7, 2010.
- LIMA, G.S. **Estudo da atividade tripanossomicida e leishmanicidade de extratos, frações e terpenos de *Croton cajucara* benth.** (Tese) Doutorado em Ciência, Tecnologia e Inovação em Agropecuária - Universidade Federal Rural do Rio De Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.
- LOMBARDI, J.A.; GROppo, M.; BIRAL, L. ***Celastraceae* in Lista de Espécies da Flora do Brasil.** Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB6746>>. Acesso em: 27 Jan. 2015.
- LSPV. **Laboratório de Sistemática de Plantas Vasculares.** Disponível em: <http://www.thecompositaehut.com/www_tch/webcurso_spv/familias_pv/celastraceae.html> acesso em 24/01/2015.

- MACARI, P.A.T.; PORTELA, C.N.; CELANI, F.B.; POHLIT, A.M. Isolamento de um flavonóide da casca de *Maytenus guyanensis*. **XXVI Reunião Anual sobre Evolução, Sistemática e Ecologia Micromoleculares**, 2004.
- MACARI, P.A.T.; PORTELA, C.N.; POHLIT, A.M. Antioxidant, cytotoxic and UVB-absorbing activity of *Maytenus guyanensis* Klotzch. (Celastraceae) bark extracts. **Acta Amaz.**, v. 36, n. 4, p. 513-518, 2006.
- MADUREIRA, M. C.; MARTINS, A. P.; GOMES, M.; PAIVA, J.; PROENÇA DA CUNHA, A.; ROSÁRIO, V. Antimalarial activity of medicinal plants used in traditional medicine in S Tomé and Príncipe islands. **J Ethnopharmacol.**, v. 81, n.1, p. 23-29, 2002
- MAES, L.; GERMONPREZ, N.; QUIRIJNEN, L.; VAN PUYVELDE, L.; COS, P.; VANDEN BERGHE, D. Comparative activities of the triterpene saponin maesabalide III and liposomal amphotericin B (AmBisome) against *Leishmania donovani* in hamsters. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 48, n. 6. p. 2056-2060, 2004.
- MAGALHÃES, E.A.; SILVA, J.G.J.; DE-CAMPOS, T.A.; SILVA, L.P.; SILVA, R.M.G. Avaliação do potencial genotóxico do extrato bruto de *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers, Bignoneaceae, em medula óssea de camundongos. **Rev Bras Farmacogn.**, v. 20, n. 1, p. 65-69, 2010.
- MAHIOU, V.; ROBLLOT, F.; HOCQUEMILLER, R.; CAVÉ, A.; ARIAS, A.R.; YALUFF, G.; FOURNET, A.; ANGELO A. New aporphine alkaloids from *Guatteria foliosa*. **J Nat Prod.**, v. 57, n. 7, p. 890-895, 1994.
- MAIA, B.L.; LIMA, E. S.; VASCONCELLOS, M. C. Avaliação da Atividade Hemolítica, Coagulante e Antiagregante Plaquetária do Extrato Seco da Casca de *Maytenus guianensis*. **61ª Reunião Anual da SBPC**, 2009.
- MAIMONE, T.J.; BARAN, P.S. Modern synthetic efforts toward biologically active terpenes. **Nat Chem Biol.**, v. 3, n. 7, p. 396-407, 2007.
- MAREGESI, S.M., HERMANS, N., DHOOGHE, L., CIMANGA, K., FERREIRA, D., PANNECOUQUE, C., DERGHE, D.A.V., COS, P., MAES, L., VLIETINCK, A.J., APERS, S., PIETERS, L. Phytochemical and biological investigations of *Elaeodendron schlechteranum*. **J Ethnopharmacol.**, 129, n. 3, 319-326, 2010.
- MARIATH, I.R.; FALCÃO, H.S.; BARBOSA-FILHO, J.M.; SOUSA, L.C.F.; TOMAZ, A.C.; BATISTA, L.M.; DINIZ, M.F.F.M.; ATHAYDE-FILHO, P.F.; TAVARES, J.F.; SILVA, M.S.; CUNHA, E.V.L. Plants of the American continent with antimalarial activity. **Rev Bras Farmacogn.**, v. 19, n. 1a, p. 158-191, 2009.
- MARQUES, M.F.S.; KATO, L.; LEITÃO FILHO, H.F.; REIS, F.A.M. Indole alkaloid from *Aspidosperma ramiflorum*. **Phytochemistry.**, v. 41, n. 3, p. 963-967, 1996.
- MARR, A.K.; MCGWIRE, B.S.; MCMMASTER, W.R. Modes of action of leishmanicidal antimicrobial peptides. **Future Microbiol.**, v. 7, n. 9, p. 1047-1059, 2012.
- MARTINS, M.V.; ESTEVAM, C.S.; SANTOS, A.L.L.; DIAS, A.S.; SILVA, Y.K.C.; ESTEVES, C.S.; SANTOS, A.L.L.M.; DIAS, A.S.; ARAUJO-JUNIOR, J.X.; MIRANDA, A.L.; BARRETO, E.J.; PIZZA, C.; PIACENTE, S.; MONTORO, P.; QUINTAS-JUNIOR, L.J.; ARAUJO, B.S.; MOREIRA, M.S.A.; SANT'ANA, A.E.G. Antinociceptive effects of an extract, fraction and an isolated compound of the stem bark of *Maytenus rigida*. **Rev Bras Farmacogn.**, v. 22, n. 3, p. 598-603, 2012.

- MAYER, D.C.; BRUCE, M.; KOCHUROVA, O.; STEWART, J.K.; ZHOU, Q. Antimalarial activity of a cis-terpenone. **Malar J.**, v. 8, n. 139, p. 1-4, 2009.
- MAZZANTI, G.; BATTINELLI, L.; SALVATORE, G. Antimicrobial properties of the linalool-rich essential oil of *Hyssopus officinalis* L. var. *decumbens* (Lamiaceae). **Flav Fragr J.**, v. 13, n. 5, p. 289-294, 1998.
- MEDINA, J.M.; RODRIGUES, J.C.; DE SOUZA, W.; ATELLA, G.C.; BARRABIN, H. Tomatidine promotes the inhibition of 24-alkylated sterol biosynthesis and mitochondrial dysfunction in *Leishmania amazonensis* promastigotes. **Parasitology.**, v. 139, n. 10, p. 1253-1265, 2012.
- MELO, A.M.; D'ALBUQUERQUE, I.L.; LACET, Y. Primeiras observações do uso tópico de primina, plumbagina e maitenina em pacientes com câncer de pele. **Rev Inst Antibióticos.**, v. 14, n. 1, p. 9-16, 1974.
- MELO, S.F.; SOARES, S.F.; COSTA, R.F.; DA-SILVA, C.R.; OLIVEIRA, M.B.N.; BEZERRA, R.J.A.C.; CALDEIRA-DE-ARAÚJO, A.; BERNARDO-FILHO, M. Effect of the *Cymbopogon citratus*, *Maytenus ilicifolia* and *Baccharis genistelloides* extracts against the stannous chloride oxidative damage in *Escherichia coli*. **Mut Res.**, v. 496, n. 1-2, p. 33-38, 2001.
- MENA-REJÓN, G.J.; PÉREZ-ESPADAS, A.R.; MOO-PUC, R.E.; CEDILLO-RIVERA, R.; BAZZOCCHI, I.L.; JIMÉNEZ-DÍAZ, I.A.; QUIJANO, L. Antigiardial activity of triterpenoids from root bark of *Hippocratea excelsa*. **J Nat Prod.** v. 70, n. 5, p. 863-865, 2007.
- MENDES, S.S.; ANDRADE, J.A.; XAVIER, M.A.; SECUNDO, J.J.A.; PANTALEÃO, S.M.; ESTEVAM, C.S.; GARCIA, C.A.B.; FERRARI, S.F. Genotoxicity test of *Maytenus rigida* and *Aristolochia birostris* in the radicular meristem of the onion, *Allium cepa*. **Rev Bras Farmacogn.**, v. 22, n.1, p. 76-81, 2012.
- MENEGUETTI, D.U.O.; CUNHA, R.M.; LIMA, R.A.; OLIVEIRA, F.A.S.; MEDEIROS, D.S.S.; PASSARINI, G.M.; MEDEIROS, P.S.M.; MILITÃO, J.S.L.T.; FACUNDO, V.A. Antimalarial ethnopharmacology in the Brazilian Amazon. **Rev Ciênc Farm Básica Apl.**, 2015a *in press*.
- MENEGUETTI, D. U. O. ; LIMA, R. A. ; SILVA, F. C. ; PASSARINI, G. M. ; FACUNDO, J. B. ; PAGOTTO, R. C. ; MILITAO, J. S. L. T. ; FACUNDO, V. A. . Acute genotoxicity analysis *in vivo* of the aqueous extract of *Maytenus guyanensis* Amazonian chichuá. **Rev Bras Farmacogn**, v. 25, n. 2, p. 164-169, 2015b.
- MENEGUETTI, D.U.O.; OLIVEIRA, F.A.S.; LIMA, R.A.; CARNEIRO, F.A.M.; FREITAG, E.M.; MEDEIROS, D.S.S.; PASSARINI, G.M.; MEDEIROS, P.S.M.; FACUNDO, V.A. Atividade antiplasmodial da fração (acetato de etila) obtidos da entrecasca de *Maytenus guyanensis* Klotzsch ex Reissek (Celastraceae), xixuá amazônico. **50º Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 2014a.
- MENEGUETTI, D.U.O.; SILVA, F.C.; ZAN, R.A.; RAMOS, L.J. Adaptation of the micronucleus technique in *Allium cepa*, for mutagenicity analysis of the Jamari river valley, western Amazon, Brazil. **J Environment Analytic Toxicol.**, v. 2, n.2, 2012.
- MENEGUETTI, D.U.O.; LIMA, R.A.; SILVA, J.B.; SILVA, R.P.; PAGOTTO, R.C.; FACUNDO, V.A. Análise citotóxica e mutagênica do extrato aquoso de *Maytenus Guyanensis* Klotzsch Ex Reissek (Celastraceae) chichuá (xixuá) amazônico. **Ciênc Natura.**, 36, n. 3, p. 301-309, 2014b.

- MENESES-PEREIRA, M.; ALCÂNTARA, A.F.C.; PILO-VELOSO, D.; RASLAN, D.S. NMR structural analysis of braznitidumine: a new indole alkaloid with 1,2,9-triazabicyclo [7.2.1] system, isolated from *Aspidosperma nitidum* (Apocynaceae). **J Braz Chem Soc.**, v. 17, n. 7, p. 1274-1280, 2006.
- MESLIN, B.; ZALILA, H.; FASEL, N.; PICOT, S.; BIENVENU, A.L. Are protozoan metacaspases potential parasite killers?. **Parasit Vectors.**, v. 4, n. 26, p. 1-7, 2011.
- MESQUITA, M.L.; DESRIVOT, J.; BORIES, C.; FOURNET, A.; PAULA, J.E.; GRELLIER, P.; ESPINDOLA, L.S. Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian Cerrado plants. **Mem Inst Oswaldo Cruz.**, v. 100, n. 7, p. 783-787, 2005.
- MESQUITA, M.L.; GRELLIER, P.; MAMBU, L.; DE PAULA, J.E.; ESPINDOLA, L.S. *In vitro* antiplasmodial activity of Brazilian Cerrado plants used as traditional remedies. **J Ethnopharmacol.** v.110, n. 1, p. 165-170, 2007.
- MIRANDA, I.S.; ABSY, M.L. Fisionomia das Savanas de Roraima, Brasil. **Acta Amaz.**, v. 30, n. 3, p. 423-440, 2000.
- MIRANDA, I.S. Análise florística e estrutural da vegetação lenhosa do Rio Comemoração, Pimenta Bueno, Rondônia, Brasil. **Acta Amaz.**, v. 30, n. 3, p. 393-422, 2000.
- MITAINE, A.C.; WENIGER, B.; SAUVAIN, M.; LUCUMI, E.; ARAGON, R.; ZECHES-HANROT, M. Indole alkaloids from the trunk bark of *Aspidosperma megalocarpon*. **Planta Med.**, v. 64, n. 5, p. 487-487, 1998;.
- MITAINE-OFFER, A.C.; SAUVAIN, M.; VALENTIN, A.; CALLAPA, J.; MALLIE, M.; ZECHES-HANROT, M. Antiplasmodial activity of *Aspidosperma indole* alkaloids. **Phytomedicine.**, v. 9, n. 2, p. 142-145, 2002.
- MOHAMED, F.A.; PERWEZ, A. Anti-inflammatory activity and qualitative analysis of different extracts of *Maytenus obscura* (A. Rich.) Cuf. by high performance thin layer chromatography method. **Asian Pac J Trop Biomed.**, v. 4, n. 2, p. 152-157, 2014.
- MOMTAZ, S.; HUSSEIN, A.A.; OSTAD, S.N.; ABDOLLAHI, M.; LALL, N. Growth inhibition and induction of apoptosis in human cancerous HeLa cells by *Maytenuspro cumbens*. **Food Chem Toxicol.**, v. 51, n. 1, p. 38-45, 2013.
- MONTANARI, T.; BEVILACQUA, E. Effect of *Maytenus ilicifolia* Mart. on pregnant mice. **Contraception.**, v. 65, n. 2, p. 171-175, 2002.
- MONTANARI, T.; CARVALHO, J.E.; DOLDER, H. Effect of *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex. Reiss on spermatogenesis. **Contraception.**, v. 57, n. 335-339, 1988.
- MOO-PUCA, J.A.; QUINTELA, Z.M.; LOPEZ, G.M.; MOO-PUCA, R.E.; QUIJANOC, L. Isolation and antitrichomonal activity of the chemical constituents of the leaves of *Maytenus phyllanthoides* Benth. (Celastraceae). **Quím Nova.**, v. 37, n. 1, p. 85-88, 2014.
- MORITA, H.; HIRASAWA, Y.; MUTO, A.; YOSHIDA, T.; SEKITA, S.; SHIROTA, O. Antimitotic quinoid triterpenes from *Maytenus chuchuhuasca*. **Bioorg Med Chem Lett.**, v. 18, n. 3, p. 1050-1052, 2008.
- MOTA, K.S.L.; PITA, J.C.L.R.; ESTEVAM, E.C.; MEDEIROS, V.M.; TAVARES, J.F.; AGRA, M.F.; DINIZ, M.F.F.M.; SILVA, M.S.; BATISTA, L.M. Evaluation of the toxicity and antiulcerogenic activity of the ethanol extract of *Maytenus obtusifolia* Mart. Leaves. **Braz J Pharmacog.**, v. 18, n.3, p. 441-446, 2008.

- MUHAMMAD, I.; BEDIR, E.; KHAN, S.I.; TEKWANI, B.L.; KHAN, I.A.; TAKAMATSU, S.; PELLETIER, J.; WALKER, L.A. A new antimalarial quassinoid from *Simaba orinocensis*. **J Nat Prod.**, v. 67, n. 5, p. 772-777, 2004.
- MUHAMMAD, I.; EL SAYED, K.A.; MOSSA, J.S.; AL-SAID, M.S.; EL-FERALY, F.S.; CLARK, A.M.; HUFFORD, C.D.; OH, S.; MAYER, A.M. Bioactive 12- oleanene triterpene and secotriterpene acids from *Maytenus undata*. **J Nat Prod.** v. 63, n. 5, p. 605-610, 2000.
- MUTHAURA, C.N.; RUKUNGA, G.M.; CHHABRA, S.C.; OMAR, S.A.; GUANTAI, A.N.; GATHIRWA, J.W.; TOLO, F.M.; MWITARI, P.G.; KETER, L.K.; KIRIRA, P.G.; KIMANI, C.W.; MUNGAI, G.M.; NJAGI, E.N. Antimalarial activity of some plants traditionally used in treatment of malaria in Kwale district of Kenya. **J Ethnopharmacol.**, v. 112, n. 3, 545-451, 2007.
- NAKAGAWA, H.; TKAISHI, Y.; FUJIMOTO, Y.; DUQUE, C.; GARZON, C.; SATO, M.; OKAMOTO, M.; OSHIKAWA, T.; AHMED, S.U. Chemical constituents from the Colombian medicinal plant *Maytenus laevis*. **J Nat Prod.**, v. 67, n. 11, p. 1919-24, 2004.
- NATHAN, S.S.; HISHAM, A.; JAYAKUMAR, G. Larvicidal and growth inhibition of the malaria vector *Anopheles stephensi* by triterpenes from *Dysoxylum malabaricum* and *Dysoxylum beddomei*. **Fitoterapia.**, v. 79, n. 2, p. 106-111, 2008.
- NEGRI, M. L. S.; POSSAMAI, J. C.; NAKASHIMA, T. Atividade antioxidante das folhas de espinheira-santa – *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss., secas em diferentes temperaturas. **Rev Bras Farmacogn.**, v. 19, n. 2b, p. 553-556, 2009.
- NESSLANY, F.; BRUGIER, S.; MOURIES M.A.; CURIEUX, F.; MARZIN, D. *In vitro* and *in vivo* chromosomal aberrations induced by megazol. **Mut Res.**, v. 560, n. 2, p. 147-158, 2004.
- NIERO, R.; MAFRA, A.P.; LENZI, A.C.; CECHINEL-FILHO, V.; TISCHER, C.A.; MALHEIROS, A.; DE SOUZA, M.M.; YUNES, R.A.; DELLE MONACHE, F. A new triterpene with antinociceptive activity from *Maytenus robusta*. **Nat Prod Res.**, v. 20, n. 14, p. 1315-20, 2006.
- NIERO, R.; ANDRADE, S.F.; CECHINEL FILHO, V. A review of the ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of plants of the *Maytenus* genus. **Curr Pharm.**, v. 17, n. 18, p. 1851-1871, 2011.
- NOEDL, H.; WERNSDORFER, W.H.; MILLER, R.S.; WONGSRICHANALAI, C. Histidine-rich protein II: a novel approach to malaria drug sensitivity testing. **Antimicrob Agents Chemother.**, v.46, n. 6, p.1658-1664, 2002.
- NOZAKI, H.; SUZUKI, H.; HIRAYAMA, T.; KASAI, R.; WU, R.Y.; LEE, K.H. Antitumor triterpenes of *Maytenus diversifolia*. **Phytochemistry.**, v. 25, n. 2, p. 479-485, 1986.
- NUNOMURA, R.C.S.; SILVA, E.C.C.; OLIVEIRA, D.F.; GARCIA, A.M.; BOELONI, J.N.; NUNOMURA, S.M.; POHLIT, A.M. *In vitro* studies of the anthelmintic activity of *Picrolemma sprucei* Hook. f. (Simaroubaceae). **Acta Amaz.**, v. 36, n. 3, p. 327-330, 2006.
- OBERLIES, N.H.; BURGESS, J.P.; NAVARRO, H.A.; PINOS, R.E.; FAIRCHILD, C.R.; PETERSON, R.W.; SOEJARTO, D.D.; FARNSWORTH, N.R.; KINGHORN, A.D.; WANI, M.C.; WALL, M.E. Novelbioactive clerodane diterpenoids from the leaves and twigs of *Casearia sylvestris*. **J Nat Prod.**, v. 65, n. 2, p. 95-99, 2002.
- OKUNADE, A.L.; LEWIS, W.H. *Oleanene constituents of Lantana cujabensis*. **Fitoterapia.**, v. 75, n. 3-4, p. 327-331, 2004.

OLIVEIRA, A.; MESQUITA, J.T.; TEMPONE, A.G.; LAGO, J.H.G.; GUIMARÃES, E.F.; KATO, M.J. Leishmanicidal activity of an alkenylphenol from *Piper malacophyllum* is related to plasma membrane disruption. **Exp Parasitol.**, v. 132, n. 3, p. 383-387, 2012.

OLIVEIRA, A.J.B.; KOIKE, L.; REIS, F.A.M.; SHEPHERD, S.L.K. Callus culture of *Aspidosperma ramiflorum* Muell. Arg.: growth and alkaloid production. **Acta Scient.**, v. 23, n. 2, p. 609-612, 2001.

OLIVEIRA, D.R.; COSTA, A.; LEITÃO, G.G.; CASTRO, N.G.; DOS SANTOS, J.P.; LEITÃO, S.G. Estudo etnofarmacognóstico da saracuramirá (*Ampelozizyphus amazonicus* Ducke), uma planta medicinal usada por comunidades quilombolas do Município de Oriximiná-PA, Brasil. **Acta Amaz.**, v. 41, n. 3, p. 383-392, 2011.

OLIVEIRA, V.B.; VIEIRA, I.J.C.; BRAZ-FILHO, R.; MATHIAS, L.; LOPES, N.P.; CROTTI, A.E.M.; UCHÔA, D.E.A. Spruceanumines A and B, novel plumeran indole alkaloids from *Aspidosperma spruceanum* (Apocynaceae). **J Braz Chem Soc.**, v. 20, n. 4, p. 753-759, 2009.

OLIVEIRA, V.B.; FREITAS, M.S.M.; MATHIAS, L.; BRAZ-FILHO, R.; VIEIRA, I.J.C. Atividade biológica e alcalóides indólicos do gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae): uma revisão. **Rev Bras Plantas Med.**, v. 11, n. 1, p. 92-99, 2009.

OLIVEIRA, V.B. **Potencial dos frutos de *Xylopia aromática* (Lam.) Mart. (Annonaceae) no tratamento de alterações metabólicas, induzidas por dieta em camundongos balb/c.** (Dissertação) Mestrado em Ciência de Alimentos - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, 2012.

OLIVEIRA, C.R.; SEVER, M.A.C.; DE MORAES, M.O.; DE MELO, L.V.; GOMES, A.P.; SILVA, R.L.; DOS SANTOS, M.L. Avaliação citotóxica em três linhagens de células tumorais das frações obtidas da casca do caule de *Salacia crassifolia* (MART. ex. Schult.) G. Dom. (Celastraceae). **Rev colomb cienc quim farm.**, v. 41, n. 2, p. 133-142, 2012.

OLIVEIRA, J.M.; YAMASHITA, M.; MENEGUETTI, D. U. O. Análise do Potencial Mutagênico em Afluentes do Rio Boa Vista Influenciados Pela Emissão de Rejeitos de Uma Indústria de Laticínios no Município de Ouro Preto do Oeste RO, Brasil. **E-book VIII Jornada Científica do CEDSA**, v. 8. p. 73-88, 2013.

OOI, K.L.; MUHAMMAD, T.S.; SULAIMAN, S.F. Physalin F from *Physalis minima* L. triggers apoptosis-based cytotoxic mechanism in T-47D cells through the activation caspase-3- and c-myc-dependent pathways. **J Ethnopharmacol.**, v. 150, n. 1, p. 382-388, 2013.

ORABI, K. Y; AL-QASOUMI, S. I; EL-OLEMY, M. M; MOSSA, J. S; MUHAMMAD, I. Dihydroagarofuran alkaloid and triterpenes from *Maytenus heterophylla* and *Maytenus arbutifolia*. **Phytochemistry.**, v.58, n. 3, p.475-480, 2001.

ORAMAS, R.S.M.; CHAVEZ, H.; MARTINS, R.P.; PEREZ, L.F.; RAVELO, A.G.; BRAUN, A.E. Cytotoxic triterpenoids from *Maytenus retusa*. **J Nat Prod.**, v. 73, n. 12, p. 2029-2034, 2010.

OSAKADA, A. **Desenvolvimento inicial de sangue-de-dragão (*Croton lechleri* MULL. ARG) sob diferentes classes de solos, corretivos e níveis de luminosidade na Amazônia central.** (Dissertação) Mestrado em Ciências Biológicas - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas, 2009.

OSORIO-DE-CASTRO, C.G.S.; MIRANDA, E.S.; ESHER, A.; CAMPOS, M.R.; BRASIL, J.C.; FERREIRA, A.C.S.; EMMERICK, I.C.M. Conhecimentos, práticas e percepções de

profissionais de saúde sobre o tratamento de malária não complicada. em municípios de alto risco da Amazônia Legal. **Ciênc saúde coletiva.**, v. 16, n. 1, p. 1445-1456, 2011.

OUANES, Z.; ABID, S.; AYED, I.; ANANE, M.T.; CREPPY, E.E.; BACHA, H. Induction of micronuclei by Zearalenone in Vero monkey kidney cells and in bone marrow cells of mice: protective effect of Vitamin E. **Mut Res.**, v. 538, n. 1-2, p. 63-70. 2003

PADUCH, R.; KANDEFER-SZERSZEŃ, M.; TRYTEK, M.; FIEDUREK, J. Terpenes: substances useful in human healthcare. **Arch Immunol Ther Exp.**, v. 55, n. 5, p. 315-327, 2007.

PAES-GONÇALVES, H.; FACUNDO, V.A.; SANTOS, D.M.F.; SILVA, A.G.C.; BALLICO, L.J.; LIMA, D.K.S.; STÁBELI, R.G.; SILVA-JARDIM, I. The leishmanicidal activity of a cyclopentenedione derivative isolated from the roots of a native Amazonian pepper (*Piper carnicconnectivum*). **Rev Bras Farmacogn.**, v. 22, n. 5, p. 1018-1023, 2012.

PARK, S.N.; LIM, Y.K.; FREIRE, M.O.; CHO, E.; JIN, D.; KOOK, J.K. Antimicrobial effect of linalool and α -terpineol against periodontopathic and cariogenic bacteria. **Anaerobe.**, v. 18, n.3, p. 369-372, 2012.

PASSEMAR, C.; SALÉRY, M.; SOH, P.N.; LINAS, M.D.; AHOND, A.; POUPAT, C.; BENOIT-VICAL, F. Indole and aminoimidazole moieties appear as key structural units in antiplasmodial molecules. **Phytomedicine.**, v. 18, n. 13, p. 1118-1125, 2011.

PEDERSEN, J.M.; BOWMAN, W.R.; ELSEGOOD, M.R.J.; FLETCHER, A.J.; LOVELL, P.J.J. Synthesis of Ellipticine: A Radical Cascade Protocol to Aryl- and Heteroaryl-Annulated[b]carbazoles. **Org Chem.**, v. 70, n. 25, p. 10615-10618, 2005.

PEREIRA, I.O.; ASSIS, D.M.; JULIANO, M.A.; CUNHA, R.L.; BARBIERI, C.L.; DO SACRAMENTO, L.V.; MARQUES, M.J.; DOS SANTOS, M.H. Natural products from *Garcinia brasiliensis* as Leishmania protease inhibitors. **J Med Food.**, v. 14, n. 3, p. 557-562, 2011.

PEREIRA, M.M.; JÁCOME, R.L.R.P.; ALCÂNTARA, A.F.C.; ALVES, R.B.; RASLAN, D.S. Alcalóides indólicos isolados de espécies do gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae). **Quim Nova.**, v. 30, n. 4, p. 970-983, 2007.

PESSUTO, M.B.; COSTA, I.C.; SOUZA, A.B.; NICOLI, F.M.; MELLO, J.C.P.; PETEREIT, F.; HEINRICH, L. Atividade antioxidante de extratos e taninos condensados das folhas de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. **Quim Nova.**, v. 32, n. 2, p. 412-426, 2009.

PIACENTE, S.; TOMMASI, N.D.; PIZZA, C. Laevisines A and B: two new sesquiterpene-pyridine alkaloids from maytenus laevis. **J Nat Prod.**, v. 62, n. 1, p. 161-163, 1999.

PIETROVSKI, E.F.; ROSA, K.A.; FACUNDO, V.A.; RIOS, K.; MARQUES, M.C.A.; SANTOS, A.R.S. Antinociceptive Properties of the Ethanolic Extract and of the Triterpene, 3 β , 6 β , 16 β -trihidroxilup-20(29)-ene Obtained From the Flowers of *Combretum leprosum* in mice. **Pharmacol Biochem Behavior.**, v. 83, n. 1, p. 90-99, 2006.

PILLAY, P.; PHULUKDAREE, A.; CHUTURGOON, A.A.; TOIT, K.D.; BODENSTEIN, J. The cytotoxic effects of *Scilla nervosa* (Burch.) Jessop (Hyacinthaceae) aqueous extract on culture HepG2 cells. **J Ethnopharmacol.**, v. 145, p. 200-204, 2013.

PINHEIRO, J.A. **Análise da Constituição Química da Madeira de Maytenus guianensis Klotzch.** (Dissertação) Mestrado em Química - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, 1980.

- PINHEIRO, P.N.Q.; PENICHE, J.S.R.; SCHALCHE, T.R.; ERREIRA, M.É.S.F.; CAMPOS, A.R.F. Aspectos farmacológicos do antimalárico lumefantrina. **Rev Para Med.**, v. 27, n. 1, p. 3532-3538, 2013.
- POLETTI, P.O.; DINIZ, A.P.; BERNARDON, B.; ZAN, R.A.; RAMOS, L.J.; MENEGUETTI, D.U.O. Análise da mutagenicidade do extrato hidrossolúvel de *Derris rariflora* (Mart. Ex Benth. J. F. Macbr: Fabaceae), timbó amazônico, através do teste micronúcleo em *Allium cepa*. **Rev Pesq & Criação.**, v. 10, n. 1, p.163-175, 2011.
- POLONSKY, J. Quassinoid bitter principles II. **Fortschr Chem Org Naturst.**, v. 47, p. 221-264, 1985.
- PRABHU, A.; KRISHNAMOORTHY, M.; JAGADEESH PRASAD, D.; NAIKD, P. Anticancer Activity of Friedelin Isolated from Ethanolic Leaf Extract of Cassia tora on HeLa and HSC-1 Cell Lines. **Indian J Appl Research.**, v. 3, n. 10, p. 1-4, 2013.
- PRATA, R.R.; MENDONÇA, M.S. Estudo anatômico do xilema secundário da raiz e do caule de *Maytenus guyanensis* Klotzsch ex Reissek (Celastraceae). **Acta Amaz.**, v. 39, n. 2, p. 261-266, 2009.
- POHLIT, A.M.; QUIGNARD, E.L.J.; NUNOMURA, S.M.; TADEI, W.P.; HIDALGO, A.F.; PINTO, A.C.S.; SANTOS, E.V.M.; MORAIS, S.K.R.; SARAIVA, R.C.G.; MING, L.C.; ALECRIM, A.M.; FERRAZ, A.B.; PEDROSO, A.C.S.; DINIZ, E.V.; FINNEY, E.K.; GOMES, E.O.; DIAS, H.B.; SOUZA, K.S.; OLIVEIRA, L.C.P.; DON, L.C.; QUEIROZ, M.M.A.; HENRIQUE, M.C.; SANTOS, M.; LACERDA JÚNIOR, O.S.; PINTO, P.S.; SILVA, S.G.; GRAÇA, Y.R. Screening of plants found in Amazonas state for lethality towards brine shrimp *Artemia franciscana*. **Acta Amaz.**, v. 33, n. 1, p. 93-104, 2003.
- REID, K.A.; MAES, J.; VAN STADEN, J.; DE KIMPE, N.; MULHOLLAND, D. A.; VESCHAEVE, L. Evaluation of the mutagenic and antimutagenic effects of South African plants. **J Ethnopharmacol.**, v. 106, n.1, p. 44-50, 2006.
- REYES, C.P.; NÚÑEZ, M.J.; JIMÉNEZ, I.A.; BUSSEROLLES, J.; ALCARAZ, M.J.; BAZZOCCHI, I.L. Activity of lupane triterpenoids from *Maytenus* species as inhibitors of nitric oxide and prostaglandin E2. **Bioorg Med Chem.**, v. 14, n. 5, p. 1573-1579, 2006.
- REVILLA, J. **Apontamentos para a cosmética amazônica**. SEBRAE-INPA, Manaus, 2002.
- RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. **Mutagênese Ambiental**. Ed Ulbra. Canoas, 2003.
- ROBERT, G.M.T.; AHOND, A.; POUPAT, C.; POTIER, P.; JACQUEMIN, H.; KAN, S.K. ASPIDOSPERMA de Guyane: alcaloides des graines de *Aspidosperma oblongum*. **J Nat Prod.**, v. 46, n. 5, p. 708-722, 1983.
- ROBERTS, S. C. Production and engineering of terpenoids in plant cell culture. **Nat Chem Biol.**, v. 3, n. 7, p. 387-395, 2007.
- RODRIGUES, A.M.S.; DE-PAULA, J.E.; DEGALLIER, N.; MOLEZ, J.F.; ESPÍNDOLA, L.S. Larvicidal activity of some Cerrado plant extracts against *Aedes aegypti*. **J Am Mosq Control Assoc.**, v. 22, n. 2, p. 314-317, 2006.
- RODRIGUES, S.B.V.; MIRANDA, R.R.S.; DUARTE, L.P.; SILVA, G.D.F.; OLIVEIRA, D.M.; LULA, I.S. Triterpenos pentacíclicos isolados de *Salacia elliptica* (Mart.) Peyr. **29º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (SBQ)**, 2006.

- RODRIGUES, V.G.; DUARTE, L.P.; SILVA, G.D.F.; SILVA, F.C.; GOES, J.V.; TAKAHASHI, J.A.; PIMENTA, L.P.S.; VIEIRA-FILHO, S.A. **Quím Nova.**, v. 35, n. 7, p. 1375-1380, 2012.
- RODRIGUES-GOULART, H.; KIMURA, E.A.; PERES, V.J.; COUTO, A.S.; AQUINO DUARTE, F.A.; KATZIN, A.M. Terpenes arrest parasite development and inhibit biosynthesis of isoprenoids in *Plasmodium falciparum*. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 48, n. 7, p. 2502-2509, 2004.
- RONDON, F.C.; BEVILAQUA, C.M.; ACCIOLY, M.P.; DE MORAIS, S.M.; DE ANDRADE-JÚNIOR, H.F.; DE CARVALHO, C.A.; LIMA, J.C.; MAGALHÃES, H.C. *In vitro* efficacy of *Coriandrum sativum*, *Lippia sidoides* and *Copaifera reticulata* against *Leishmania chagasi*. **Rev Bras Parasitol Vet.**, v. 21, n. 3, p. 185-191, 2012.
- ROSA, M.S.S.; MENDONÇA-FILHO, R.R.; BIZZO, H.R.; ALMEIDA RODRIGUES, I.; SOARES, R.M.; SOUTO-PADRÓN, T.; ALVIANO, C.S.; LOPES, A.H. Antileishmanial activity of a linalool-rich essential oil from *Croton cajucara*. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 47, n. 6, p. 1895-1901, 2003.
- RYU, Y.B.; PARK, S.J.; KIM, Y.M.; LEE, J.Y.; SEO, W.D.; CHANG, J.S.; PARK, K.H.; RHO, M.C.L.; LEE, W.S. SARS-CoV 3CL^{pro} inhibitory effects of quinone-methide triterpenes from *Tripterygium regelii*. **Bioorg Med Chem Lett.**, v. 20, n. 6, 1873-1876, 2010.
- SALAZAR, G.D.M.; DUARTE, L.P.; VIEIRA-FILHO, A.S.; SILVA, G.D.F.; LULA, I.S. *Maytenus truncata* reiss - chemical constituents. **Eur J Pharm Sci.**, v. 13, n. 1, p. 105-105, 2001.
- SALAZAR, G.D.C.M.; SILVA, G.D.F.; DE SOUSA, J.R. Chemical constituents from bark wood and leaves of *Maytenus floribunda* (Reiss). **Acta Hort.**, v. 501, n. 2, p. 205-208, 1999.
- SALMINEN, A.; LEHTONEN, M.; SUURONEN, T.; KAARNIRANTA, K.; HUUSKONEN, J. Terpenoids: natural inhibitors of NF-kappaB signaling with anti-inflammatory and anticancer potential. **Cell Mol Life Sci.**, v. 65, n. 19, p. 2979-2999, 2008.
- SANAIIOTTI, T.M.; BRIDGEWATER, S.; RATTER, J.A. A floristic study of the savana vegetation of the state of Amapá, Brazil, and suggestions for its conservation. **Bol Mus Para Emílio Goeldi.**, v. 13, n. 1, p. 3-29, 1997.
- SANTANA, C.F.; ASFORA, J.J.; COTIAS, C.T. Primeiras observações sobre o emprego da maitenina em pacientes cancerosos. **Rev Inst Antibióticos.**, v. 11, n. 1, 37-49, 1971.
- SANTORO, G.F.; CARDOSO, M.G.; GUIMARÃES, L.G.; MENDONÇA, L.Z.; SOARES, M.J. *Trypanosoma cruzi*: activity of essential oils from *Achillea millefolium* L., *Syzygium aromaticum* L. and *Ocimum basilicum* L. on epimastigotes and trypomastigotes. **Exp Parasitol.**, v. 116, n. 3, p. 283-290, 2007.
- SANTOS, A.G.; PEREZ, C.C.; TININIS, A.G.; BOLZANI, V.S.; CAVALHEIRO, A.J. Clerodane diterpenes from leaves of *Casearia sylvestris* Swartz. **Quim Nova.**, v. 30, n. 5, p. 1100-1103, 2007.
- SANTOS, A.O.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B.P.; VEIGA JUNIOR, V.F.; PINTO, A.C.; NAKAMURA, C.V. Effect of Brazilian copaiba oils on *Leishmania amazonensis*. **J Ethnopharmacol.**, v. 120, n. 2, p. 204-208, 2008.
- SANTOS, F.L.A.; LYRA, M.A.M.; ALVES, L.D.S.; SILVA, K.E.R.; ROLIM, L.A.; LUCENA, T.C.B.; FERRAZ, L.R.M.; LIMA, A.A.N.; SOARES-SOBRINHO, J.L.; ROLIM

NETO, P.J. Pesquisa, desenvolvimento e inovação para controle das doenças negligenciadas. **Rev Ciênc Farm Básica Apl.**, v. 33, n. 1, 37-47, 2012.

SANTOS, K.K.A.; ROLÓN, M.; VEGA, C.; ARIAS, A.R.; COSTA, J.G.M.; COUTINHO, H.D.M. Atividade leishmanicida *in vitro* de *Eugenia uniflora* e *Momordica charantia*. **Rev Ciênc Farm Básica Apl.**, v. 34,n.1, p. 47-50, 2013.

SANTOS, M.; FORMENTON, V.A.F.; SANTOS, P.D.; CASTRO, G.L.; ZANONI, M.V.B.; FURLAN, M. Evaluation of Antioxidant Capacity and Synergistic Associations of Quinonemethide Triterpenes and Phenolic Substances from *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae). **Molecules.**, v. 15, n. 10, p. 6956-6973, 2010.

SANTOS, V.A.F.F.M.; LEITE, K.M.; SIQUEIRA, M.C.; REGASINI, L.O.; MARTINEZ, I.; NOGUEIRA, C.T.; GALUPPO, M.K.; STOLF, B.S.; PEREIRA, A.M.S.; CICARELLI, R.M.B.; FURLAN, M.; GRAMINHA, M.A.S. Antiprotozoal Activity of Quinonemethide Triterpenes from *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae). **Molecules.**, v. 18, n. 1, p. 1053-1062, 2013.

SANTOS-OLIVEIRA, R.; COULAUD-CUNHA, S.; COLACO, W. Revisão da *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek, Celastraceae. Contribuição ao estudo das propriedades farmacológicas. **Rev Bras Farmacogn.**, v. 19, n. 2b, p. 650-659, 2009.

SCALERCIO, S.R.R.A. **Estudo teórico do mecanismo redox de derivados quinolínicos na atividade antimalárica.** (Dissertação) Mestrado em Ciências Farmacêuticas - Universidade Federal do Pará, Belém, Pará, 2010.

SEDER, R.A.; GAZZINELLI, R.; SHER, A.; PAUL, W.E. Interleukin 12 acts directly on CD4⁺ T cells to enhance priming for interferon γ production and diminishes interleukin 4 inhibition of such priming. **Proc Natl Acad Sci USA.**, v. 90, n. 21, p. 10188-10192, 1993.

SEM, R.; CHATTERJEE, M. Plant derived therapeutics for the treatment of Leishmaniasis. **Phytomedicine.**, v. 18, n. 12, p. 1056-1069, 2011.

SHAHRIM, Z.; BAHARUDDIN, P.J.N.M.; YAHYA, A.; MUHAMMAD, H.; BAKAR, R.A.; ISMAIL, Z. The *in vivo* rodent micronucleus assay of kaci fatimah (*Labisia pumila*) extract. **Trop Biomed.**, v. 23, n. 2, p. 214-219, 2006.

SHIROTA, O.; MORITA, H.; TAKEYA, K.; ITOKAWA, H. Cytotoxic aromatic triterpenes from *Maytenus ilicifolia* and *Maytenus chuchuhuasca*. **Phytochemistry.**, v. 57, n. 12, 1675-1681, 1994.

SHIROTA, O; MORITA, H; TAKEYA, K; ITOKAWA, H. Isolation of antitumor substance, dulcitol, from *Maytenus ebenifolia*. **J Natural Med.**, v. 52, n. 2, p. 184-186, 1998.

SILVA, A.A.; MORAIS, S.M.; FALCÃO, M.J.; VIEIRA, I.G.; RIBEIRO, L.M.; VIANA, S.M.; TEIXEIRA, M.J.; BARRETO, F.S.; CARVALHO, C.A.; CARDOSO, R.P.; ANDRADE-JUNIOR, H.F. Activity of cycloartane-type triterpenes and sterols isolated from *Musa paradisiaca* fruit peel against *Leishmania infantum* chagasi. **Phytomedicine.**, v. 21, n. 11, p. 1419-1423, 2014b.

SILVA, E.C.C.; CAVALCANTI, B.C.; AMORIM, R.C.; LUCENA, J.F.; QUADROS, D.S.; TADEI, W.P.; MONTENEGRO, R.C.; COSTA-LOTUFO, L.V.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; NUNOMURA, R.C.; NUNOMURA, S.M.; MELO, M.R.; ANDRADE-NETO, V.F.; SILVA, L.F.; VIEIRA, P.P.; POHLIT, A.M. Biological activity of neosergeolide and isobrucein B (and two semi-synthetic derivatives) isolated from the Amazonian medicinal

plant *Picrolemma sprucei* (Simaroubaceae). **Mem Inst Oswaldo Cruz.**, v. 104, n. 1, p. 48-56, 2009.

SILVA, G.N.; MARIA, N.R.; SCHUCK, D.C.; CRUZ, L.N.; DE MORAES, M.S.; NAKABASHI, M.; GRAEBIN, C.; GOSMANN, G.; GARCIA, C.R.; GNOATTO, S.C. Two series of new semisynthetic triterpene derivatives: differences in anti-malarial activity, cytotoxicity and mechanism of action. **Malar J.**, v. 12, n. 89, p. 1-7, 2013.

SILVA, J.L.; SILVA, R.P.; JORGE, R.M.; SILVA, G.D. VIEIRA FILHO, S.A.F.; FONSECA, A.P.N.D.; TAGLIATI, C.A. Avaliação da atividade antiulcerogênica da *Maytenus truncata* Reiss (Celastraceae). **Braz J Pharmacog.**, v. 15, n.1, p. 30-35, 2005.

SILVA, J.M.; ANTINARELLI, L.M.; PINTO, N.C.; COIMBRA, E.S.; SOUZA-FAGUNDES, E.M.; RIBEIRO, A. HPLC-DAD analysis, antileishmanial, antiproliferative, and antibacterial activities of *Lacistema pubescens*: an Amazonian medicinal plant. **Biomed Res Int.**, v. 2014, p. e545038, 2014a.

SILVA, J.M.; MOTTA, E.V.S.; MENDES, R.; SCIO E. Caracterização fitoquímica e avaliação da capacidade antioxidante de diferentes partições de *Lacistema pubescens* Mart. **HU Revista.**, v. 37: n. 3, p. 342-347, 2011.

SILVA, J.M.; MOTTA, E.V.S.; MENDES, R.F.; BELLOZI, P.M.Q.; LIMA, I.V.A.; RIBEIRO, A.; SCIO, E. Antiinflammatory and antinociceptive activities of the hexane extract of *Lacistema pubescens* mart. Leaves. **Ph Ol.**, 1, n. 1, p. 9-15, 2012.

SILVA, L.F.; LIMA, E.S.; VASCONCELLOS, M.C.; ARANHA, E.S.; COSTA, D.S.; MUSTAFA, E.V.; MORAIS, S.K.; ALECRIM, M.D.; NUNOMURA, S.M.; STRUWE, L.; DE ANDRADE-NETO, V.F.; POHLIT, A.M. *In vitro* and *in vivo* antimalarial activity and cytotoxicity of extracts, fractions and a substance isolated from the Amazonian plant *Tachia grandiflora* (Gentianaceae). **Mem Inst Oswaldo Cruz.**, v. 108, n. 4, p. 501-507, 2013.

SILVA, M.F. **Estudos *in vitro* de potenciais antimaláricos nos estágios intraeritrocítico de *Plasmodium falciparum*.** (Dissertação) Mestrado em Ciências Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro - Instituto de Ciências Biomédicas (ICB). Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, 2012.

SILVA, S.L.; FIGUEIREDO, P.M.; YANO, T. Cytotoxic evaluation of essential oil from *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. leaves. **Acta Amaz.**, v. 37, n. 2, p. 281-286, 2007.

SILVA, T.H.A.; OLIVEIRA, M.T.; SANTOS, H.F.; OLIVEIRA, A.B.; DE ALMEIDA, W.B. Estudo de modelagem molecular de complexos ferriprotoporfirina-IX e quinolinocarbinolaminas antimaláricas: proposta de um farmacóforo. **Quím Nova.**, v. 28, n. 2. p. 244-249, 2005.

SILVA, A.M.; SOUZA, A.M.; MACIEL, F.P.; DINIZ, A.P.; ZAN, R.A.; RAMOS, L.J.; BARBOSA, N.V.; MENEGUETTI, D.U.O. Analysis Physical-chemical, Mutagenic and Antimutagenic de *Morinda Citrifolia* L. (Rubiaceae: Rubioideae) Noni, Germinated in the Region of Brazilian West Amazon. **Open Access Scien Repor**, v. 1, n. 12, p. e569, 2012.

SILVA, F.C.; BARROS, M.A.B.; VIANA, R.R.; ROMÃO, N.F.; OLIVEIRA, M.S.; MENEGUETTI, D.U.O. Avaliação de mutagênese provocada por sulfato de ferro através do teste micronúcleo em células da medula óssea de camundongos. **Rev Cie Fac Edu Mei Amb.**, v. 2, n. 1, p. 13-21, 2011.

SILVA, F.C.; DUARTE, L.P.; SILVA, G.D.F.; VEIRA-FILHO, S.A.; LULA, I.S.; TAKAHASHIC, J.A.; SALLUMC, W.S.T. J. Chemical constituents from branches of

- Maytenus gonoclada (Celastraceae) and evaluation of antimicrobial activity. **Braz Chem Soc.**, v. 22, n. 5, p. 943-949, 2011.
- SILVA, J.A.; COSTA, R.S.; MARIANO, A.S.; SANTOS, K.L.S.; SILVA, C.O.J. Análise farmacognóstica de amostras de espinheira santa - *Maytenus ilicifolia* (Schrad.) Planch. (Celastraceae) comercializadas em farmácias e banca popular de Votuporanga – São Paulo. **Rev Bras Farmacogn.**, v. 93, n. 4, p. 457-462, 2012.
- SILVA-JARDIM, I.; FATIMAHORTA, M.; RAMALHOPINTO, F. The *Leishmania chagasi* proteasome: role in promastigotes growth and amastigotes survival within murine macrophages. **Acta Tropica.**, v. 91, n.2, p. 121-130, 2004.
- SILVA, L.R.; FERREIRA, M.M.C. Estudo do coeficiente de partição octanol-água de bifenilas policloradas (PCBs) utilizando parâmetros topológicos. **Quím Nova.**, v. 26, n. 3, p. 312-318, 2003.
- SILVA, M.S.; SOUSA, D.P.; MEDEIROS, V.M.; FOLLY, M.A.B.; TAVARES, J.F.; BARBOSAFILHO, J. Alkaloid, flavonoids, and pentacyclic triterpenoids of *Maytenus obtusifolia* Mart. **Biochem Syst Ecol.**, v. 36, n. 5, p. 500-503, 2008.
- SIMMONS, M.P.; SAVOLAINEN, V.; CLEVINGER, C.C.; ARCHER, R.H.; DAVIS, J.I. Phylogeny of the Celastraceae inferred from 26S nuclear ribosomal DNA, phytochrome B, rbcL, atpB, and morphology. **Mol Phylogenet Evol.**, v. 19, n. 3, p. 353 -366, 2001.
- SINGH, N.P.; MCCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHENEIDER, A. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp Cell Res.**, v. 175, n. 1, p. 184-191, 1988.
- SOARES, D.C.; ANDRADE, A.L.; DELORENZI, J.C.; SILVA, J.R.; FREIRE-DE-LIMA, L.; FALCÃO, C.A.; PINTO, A.C.; ROSSI-BERGMANN, B.; SARAIVA, E.M. Leishmanicidal activity of *Himatanthus sucuuba* latex against *Leishmania amazonensis*. **Parasitol Int.**, v. 59, n. 2, p. 173-177, 2010.
- SOARES, M.B.P.; BELLINTANI, M.C.; RIBEIRO, I.M.; TOMASSINI, T.C.; SANTOS, R.R. Inhibition of macrophage activation and lipopolysaccharide-induced death by seco-steroids purified from *Physalis angulata* L. **Eur J Pharmacol.**, v. 459, n. 1, p. 107-112, 2003.
- SOARES, M.B.P.; BRUSTOLIM, D.; SANTOS, L.A.; BELLINTANI, M.C.; PAIVA, F.P.; RIBEIRO, Y.M.; TOMASSINI, T.C.; RIBEIRO DOS SANTOS, R. Physalins B, F and G, seco-steroids purified from *Physalis angulata* L., inhibit lymphocyte function and allogeneic transplant rejection. **Int Immunopharmacol.**, v. 6, n. 3, p. 408-414, 2006.
- SOARES-BEZERRA, R.J.; LEON, L.; GENESTRA, M. Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármacos. **Rev Bras Cienc Farm.**, v. 40, n. 2, p. 139-149, 2004.
- SOBRINHO, J.L.; MEDEIROS, F.P.M.; LA ROCA, M.F.; SILVA, K.R.; LIMA, L.N.A.; NETO, P.J.R. Delineamento de alternativas terapêuticas para o tratamento da doença de Chagas. **Rev Patol Trop.**, v. 36, n. 2, p. 103-118, 2007.
- SOTANAPHUN, U.; SUTTISRI, R.; LIPIPUN, V.; BAVOVADA, R. Quinone-methide triterpenoids from *Glyptopetalum sclerocarpum*. **Phytochemistry.**, v. 49, n. 6, 1749-1755, 1998.
- SOUZA, A.P.; SILVA, R.P.; ABREU, B.R.R.; FERRAZ, A.B.F.; DIHL, M.L.R.R. Genotoxicidade associada ao extrato das folhas de *Cynara scolymus* L. em células humanas HepG2. **Rev Inic Cient da Ulbra.**, v. 11, n. 1, p. 31-38, 2013.

- SOUSA, G.F.; DUARTE, L.P.; ALCANTARA, A.F.C.; SILVA, G.D.; VIEIRA-FILHO, S.A.; SILVA, R.R.; OLIVEIRA, D.M.; TAKAHASHI, J.A. New triterpenes from *Maytenus robusta*: structural elucidation based on NMR experimental data and theoretical calculations. **Molecules.**, v. 17, n. 11, p. 13439-13456, 2012.
- SOUZA, S.A.M; CATTELAN, L.V; VARGAS, D.P.V; PIANA, C.F.B; BOBROWSKI, V.L; ROCHA, B.H.G. Atividade alelopática e citotóxica do extrato aquoso de Espinheira santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reiss). **Ci Biol Saúde.**, v.11, n.3, p. 7-14, 2005.
- SOUZA-FORMIGONI, M.L.O.; OLIVEIRA, M.G.; SILVEIRA-FILHO, N.G.; BRAZ, S.; CARLINI, E.A. Antiulcerogenic effects of two *Maytenus* species in laboratory animals. **J Ethnopharmacol.**, v. 34, n. 1, p. 21-27, 1991.
- SPIVEY A.C.; WESTON, M.; WOODHEAD, S. Celastraceae sesquiterpenoids: biological activity and synthesis. **Chem Soc Rev.**, v. 31, n. 1, p. 43-59, 2002.
- SRIVASTAVA, I.K.; ROTTENBERG, H.; VAIDYA, A.B. Atovaquone, a broad spectrum antiparasitic drug, collapses mitochondrial membrane potential in a malarial parasite. **J Biol Chem.**, v. 272, n. 7, p. 3961-3966, 1997.
- STURBELLE, R.; PINHO, D.S.; RESTANI, R.G.; OLIVEIRA, G.R.; GARCIAS, G.L.; MARTINO-ROTH, M.G. Avaliação da atividade mutagênica e antimutagênica da *Aloe vera* em teste de *Allium cepa* e teste de micronúcleo em linfócitos humanos binucleados. **Rev Bras Farmacogn.**, v. 20, n.3, p. 409-415, 2010.
- SULSEN, V.P.; FRANK, F.M.; CAZORLA, S.I.; ANESINI, C.A.; MALCHIODI, E.L.; FREIXA, B.; VILA, R.; MUSCHIETTI, L.V.; MARTINO, V.S. Trypanocidal and leishmanicidal activities of sesquiterpene lactones from *Ambrosia tenuifolia* Sprengel (Asteraceae). **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 52, n. 7, p. 2415-2419, 2008.
- TANAKA, J.C.A.; DA SILVA, C.C.; FERREIRA, I.C.; MACHADO, G.M.; LEON, L.L.; DE OLIVEIRA, A.J. Antileishmanial activity of indole alkaloids from *Aspidosperma ramiflorum*. **Phytochemistry.**, v. 16, n. 6, p. 377-380, 2007.
- TELES, C.B.G; MOREIRA-DILL, L.S.; SILVA, A.A.; FACUNDO, V.A.; DE AZEVEDO, W.F.J; DA SILVA, L.H.; MOTTA, M.C.; STÁBELI, R.G.; SILVA-JARDIM, I. A lupane-triterpene isolated from *Combretum leprosum* Mart. fruit extracts that interferes with the intracellular development of *Leishmania (L.) amazonensis* in vitro. **BMC Complement Altern Med.**, v. 15, n. 1, p. 165, 2015.
- TELES, C.B.G.; MOREIRA-DILL, L.S.; SILVA, A.A.E.; FACUNDO, V.A.; ZULIANI, J.P.; STÁBELI, R.G.; SILVA-JARDIM, I. Activity of the Lupane isolated from *Combretum leprosum* against *Leishmania amazonensis* promastigotes. **J Braz Chem Soc.**, v. 22, n.5, p. 936-942, 2011.
- TEMPONE, A.G.; TEIXEIRA, D.; PRADO, F.O.; CALIXTO, I.A.R.L.; LORENZI, H.; MELHEM, M.S.C. Brazilian flora extracts as source of novel antileishmanial and antifungal compounds. **Mem Inst Oswaldo Cruz.**, v. 103, n. 5, p. 443-449, 2008.
- TEOFILO, V.H.M. **Estudo da resistência aos antimaláricos sulfadoxina e pirimetamina em *Plasmodium falciparum* nas ilhas de São Tomé e Príncipe: origem das mutações pontuais nos genes DHFR e DHPS.** (Dissertação) Mestrado em Biologia Humana e Ambiente - Universidade de Lisboa, 2008.

- TIBERTI, L. A.; YARIWAKE, J.H.; NDJOKO, K.; HOSTETTMANN, K. Identification of flavonols in leaves of *Maytenis ilicifolia* and *M. aquifolium* (Celastraceae) by LC/UV/MS analysis. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.**, v. 846, n. 1-2, p. 378-84, 2007.
- TICE, R.R.; AGURELL, E.; ANERSON, B.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J.C.; SASAKI, Y.F. Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. **Environ Mol Mutagen.**, v. 35, n. 3, p. 206-210, 2000.
- TOLEDO, J.S.; AMBRÓSIO, S.R.; BORGES, C.H.; MANFRIM, V.; CERRI, D.G.; CRUZ, A.K.; COSTA, F.B. *In vitro* leishmanicidal activities of sesquiterpene lactones from *Tithonia diversifolia* against *Leishmania braziliensis* promastigotes and amastigotes. **Molecules.**, v. 19, n. 5, p. 6070-6079, 2014.
- TORRES-SANTOS, E.C.; LOPES, D.; OLIVEIRA, R.R.; CARAUTA, J.P.; FALCAO, C.A.; KAPLAN, M.A.; ROSSI-BERGMANN, B. Antileishmanial activity of isolated triterpenoids from *Pourouma guianensis*. **Phytomedicine.**, v. 11, n. 2-3, p. 114-120, 2004.
- TRAGER, W.; JENSEN, J.B. Human malaria parasites in continuous culture. **Science.**, v.193, n.4254, p.673-675, 1976.
- UFMG. Departamento de química. Disponível em <<http://zeus.qui.ufmg.br/~neplam/triterpenos/19.htm>> acesso em 02/04/2015.
- USTA, J.; KREYDIYYEH, S.; KNIO, K.; BARNABE, P.; BOU-MOUGHLABAY, Y.; DAGHER, S. Linalool decreases HepG2 viability by inhibiting mitochondrial complexes I and II, increasing reactive oxygen species and decreasing ATP and GSH levels. **Chem Biol Interact.**, v. 180, n. 1, p. 39-46, 2009.
- VALLADÃO, F.N.; MIRANDA, R.R.; VALE, F.H.; VALLADÃO, S.A.; SILVA, G.D.F.; DUARTE, L.P.; CARVALHO-OKANO, R.M.; MESSIAS, M.C.T.B.; VIERA FILHO, S.A. Four Brazilian *Maytenus salicifolia* Reissek (Celastraceae) groups studied by TLC and UV/Vis spectrophotometry. **Braz J Pharmacogn.**, v. 19, n. 3, p. 733-739, 2009.
- VELLOSA, J.C.R.; KHALIL, N.M.; FORMENTON, V.A.F.; XIMENES, V.F.; FONSECA, L.M.; FURLAN, M.; BRUNETTI, I.L.; OLIVEIRA, O.M. Antioxidant activity of *Maytenus ilicifolia* root bark. **Fitoterapia.**, v. 77, n. 3, p. 243- 244, 2006.
- VILLELA, I.V.; LAU, A.; SILVEIRA, J.; PRÁ, D.; ROLLA, H.C.; SILVEIRA, J D. **Bioensaios para o monitoramento de genotoxicidade ambiental.** In: SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRRQUES, J.A.P. Genética Toxicológica. Porto Alegre: Alcance, 2003.
- WANG, W.; ZHAO, J.; WANG, Y.H.; SMILLIE, T.A.; LI, X.C. Diterpenoids from *Casearia sylvestris*. **Planta Med.**, v. 75, n. 1, p. 1436-1441, 2009b.
- WANG, W.; ZULFIQAR, A.; LI, X.C.; SMILLIE, T.A.; GUO, D.A. New clerodane diterpenoids from *Casearia sylvestris*. **Fitoterapia.**, v. 80, n. 1, p. 404-407, 2009a.
- WENIGER, B.; ROBLEDO, S.; ARANGO, G.J.; DEHARO, E.; ARAGÓN, R.; MUÑOZ, V.; CALLAPA, J.; LOBSTEIN, A.; ANTON, R. Antiprotozoal activities of Colombian plants. **J Ethnopharmacol.**, v. 78, n. 2-3, 193-200, 2001.
- WIESNER, J.; HENSCHKER, D.; HUTCHINSON, D.B.; BECK, E.; JOMAA, H. *In vitro* and *in vivo* synergy of fosmidomycin, a novel antimalarial drug, with clindamycin. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 46, n. 9, p. 2889-2894. 2002

- WU, S.Y.; LEU, Y.L.; CHANG, Y.L.; WU, T.S.; KUO, P.C.; TENG, C.M.; Pan, S.L. Physalin F Induces Cell Apoptosis in Human Renal Carcinoma Cells by Targeting NF-kappaB and Generating Reactive Oxygen Species. **Plos One.**, v. 7, n. 7, p. e40727, 2012.
- X,U.R.; FAZIO, G.C.; MATSUDA, S.P.T. On the origins of triterpenoid skeletal diversity. **Phytochemistry.**, v. 65, n. 3, p. 261-291, 2004.
- XU, K.; WANG, P.; YUAN, B.; CHENG, Y.; LI, Q.; LEI, H. Structural and bioactive studies of terpenes and cyclopeptides from the Genus *Rubia*. **Chem Cent J.**, 7(1):81-81, 2013.
- YAMAGUSHI, M.Q.; GUSMAN, G.S.; VESTENA, S. Efeito alelopático de extratos aquosos de *Eucalyptus globulus* Labill. e de *Casearia sylvestris* Sw. sobre espécies cultivadas. **Semina Ci Agrárias.**, v. 32, n. 4, p. 1361-1374, 2011.
- YANG, G.; ZHONG, L.; JIANG, L.; GENG, C.; CAO, J.; SUN, X.; LIU, X.; CHEN, M.; MA, Y. 6-gingerol prevents patulin-induced genotoxicity in HepG2 cells. **Phytother Res.**, v. 25, n. 10, p. 1480-1485, 2011.
- YELANI, T.; HUSSEIN, A.A.; MEYER, J.J.M. Isolation and identification of poisonous triterpenoids from *Elaeodendron croceum*. **Nat Prod Res.**, v. 24, n. 15, 1418-1425, 2010.
- ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature.**, v. 415, p. 389-395, 2002.
- ZENG, C.Q. Cytotoxic triterpenoids and flavonoids from. **Planta Med.**, v. 60, n. 1, p. 54-57, 1994.
- ZENGIN, H.; BAYSAL, A.H. Antibacterial and antioxidant activity of essential oil terpenes against pathogenic and spoilage-forming bacteria and cell structure-activity relationships evaluated by SEM microscopy. **Molecules.**, v. 19, n. 11, p. 17773-17798, 2014.

ANEXOS

ANEXOS I

Artigo Aceito Para Publicação na Revista de Ciências Farmaceuticas Básica e Aplicada



Revista de Ciências

Farmacêuticas

Básica e Aplicada ISSN: 1808-4532 - e-ISSN:2179-443X

Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences

Araraquara, 09 de abril de 2015.

RCFBA-3741-178/2014

Em nome da Editoria Científica, temos o prazer de informar que o artigo intitulado:

Antimalarial ethnopharmacology in the Brazilian Amazon

De autoria de Dionatas Ulises de Oliveira Meneguetti, Renildo Moura da Cunha, Renato Abreu Lima, Flávio Augusto de Souza Oliveira, Daniel Sol Sol de Medeiros, Guilherme Matos Passarini, Patrícia Soares de Maria de Medeiros, Júlio Sancho Linhares Teixeira Militão, Valdir Alves Facundo foi aceito para publicação na *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*.

Enviaremos, na época oportuna, a prova gráfica para correção final.

Atenciosamente,

Eliana Aparecida Varanda
Editora Chefe

Ilmo. Sr.

Prof. Dionatas Ulises de Oliveira Meneguetti

Antimalarial ethnopharmacology in the Brazilian Amazon

Título Resumido: Antimalarial ethnopharmacology

Dionatas Ulises de Oliveira Meneguetti^{1,2,3*}, Renildo Moura da Cunha², Renato Abreu Lima^{3,4}, Flávio Augusto de Souza Oliveira^{1,3,5}, Daniel Sol Sol de Medeiros^{5,6}, Guilherme Matos Passarini^{5,6}, Patrícia Soares de Maria de Medeiros^{5,6}, Júlio Sancho Linhares Teixeira Militão^{3,7}, Valdir Alves Facundo^{1,3,7}.

1. Programa de Pós Graduação em Biologia Experimental (PPGBioExp) da Universidade Federal de Rondônia (UNIR);
2. Laboratório de Fisiofarmacologia da Universidade Federal do Acre (UFAC);
3. Laboratório de Química de Produtos Naturais (LPQPN) da Universidade Federal de Rondônia (UNIR);
4. Programa de Pós Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal (Rede Bionorte);
5. Laboratório de Quimioterapia da Malária (LQM) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ- Rondônia);
6. Departamento de Ciências Biológica da Universidade Federal de Rondônia (UNIR);
7. Departamento de Química da Universidade Federal de Rondônia (UNIR);

* Corresponding author: Getúlio Vargas Street, nº654, Center, CEP: 69900-060, Rio Branco, Acre, Brazil. e-mail dionatas@icbusp.org. Phone 55(68)9213-9022.

ABSTRACT:

The preoccupation to find new drugs for the treatment of malaria is increasing steadily due to the resistance of the parasite, which is a threat to disease control. The present study describes a literature review on the antimalarial ethnopharmacology (Anti-*Plasmodium falciparum* - in vitro) of the Brazilian Amazon plants. It was found a great diversity of plant species in the Brazilian Amazon with potential for research of new herbal and secondary metabolites with antiplasmodial action, in addition to treating other neglected parasitic diseases. However, for these studies is needed in addition to financial support, the interaction between different laboratories and research groups for the formation of multidisciplinary and interdisciplinary teams, which will enhance the research level in the region and increase the likelihood of new antimalarial drugs discovery.

Keywords: Plasmodium falciparum. Drug therapy. Ethnopharmacology.

INTRODUCTION

Malaria is an infectious and parasitic disease, not contagious, with episodes of acute manifestations and chronic evolution, which affects millions of people in tropical and subtropical regions of the world (Ferreira, 2005; Ferreira et al., 2012; WHO, 2014).

The etiological agents of malaria are protozoa of the phylum Protozoa, Sporozoea class, Plasmodiidae family and genus *Plasmodium*, of which there are five species with potential for human transmission: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* and *Plasmodium knowlesi* (Sabbatani et al., 2009; Hellemond et

al., 2009; Sá, 2011), occurring the majority in wild environment by the bite of the female mosquitoes of genus *Anopheles* (Mariath et al., 2009).

In Latin America, malaria is among the four major endemic diseases, mainly affecting people in poor countries of the American continent (Ferreira et al., 2012). In Brazil, 99% of the cases are concentrated in the Legal Amazon, where reported new cases are more than 170 thousand each year (Monteiro et al., 2013; Brasil & Daniel-Ribeiro, 2015). This higher incidence of the disease in the Amazon is owing to the fact that it is a region where conditions are favorable to the existence of the vector, due to lack of proper sanitation, disordered settlements and invasion of forests by human population (Costa et al., 2010). Besides, often reside in places of difficult access, where they are helpless in relation to basic health, having to look for alternative treatments in plant biodiversity for their illness. However, about 99% of the plants of this region have not yet proven their pharmacological effect and their active principles identified (Santos, 2009), which represents a major pharmacological and economic potential to be exploited (Cechinel-Filho & Rosendo, 1998; Fão et al., 2012).

This study aimed to perform a literature review describing the antimalarial ethnopharmacology (Anti-*Plasmodium falciparum* – *in vitro*) of plants in the Brazilian Amazon. The proposed study was due the preoccupation in search for new drugs for the treatment of malaria, due the drug resistance of the parasite, this being considered a threat to disease control (Villalobos et al., 1997), because the resistance of *P. falciparum* has been widely documented for various drugs in different countries (Dobestyn et al., 1979; Alencar et al., 1997; Reyes et al., 1985; Fontanet et al., 1993; Villalobos et al., 1997; Sidhu et al., 2002; Chen et al., 2005; Pimentel et al., 2007; Mita & Tanabe, 2012; Bolzani & Bolzani, 2013; Ariey et al., 2014).

Antimalarial Drugs

Data in literature show that of 1,535 new drugs registered between 1975 and 2004 only 1% were developed to treat tropical diseases (Dias & Dessoy, 2009; Santos et al., 2012). The figures reveal a policy of exclusive research, in which only 10% of global spending on health research is spent on diseases that affect 90% of the global burden, the challenge therefore, is to provide alternatives to treatment in affected populations that, in most of cases, presents improperly (Sobrinho et al., 2007).

The malarial *Plasmodium* has a complicated life cycle, so malaria must be treated with drug combinations, as well as therapy must be acting in each phase of this cycle and

certain criteria must be considered, such as the type of *Plasmodium*, the patient clinical classification and the group to which it is part. These aspects will determine the need for a different treatment for each situation (Osorio-de-Castro et al., 2011).

The first antimalarial drugs were created in the 1940s, being derived from natural products or synthetic compounds (Scalercio, 2010), having quinine the earliest medication used to treat malaria, which acts as an erythrocyte schizonticide with quick action, also acting on gametocytes of *P. vivax*, *P. ovale* and *P. malariae*, but having no action on tissue schizonts of *P. vivax* and *P. ovale* or gametocytes of *P. falciparum* (Gomes et al., 2011).

Quinine was discarded after the introduction of synthetic derivatives, being reintroduced when the emergence of resistant strains occurred and has been used for infections with *P. falciparum* resistant to chloroquine, as well as in the treatment of severe malaria, in which can also be used quinidine that proved to be more effective, but more toxic, than quinine (Silva et al., 2005).

Chloroquine has few adverse effects when used for chemoprophylaxis and was considered safe for pregnant women, however, when used at high doses in acute treatment, may occur nausea, vomiting, dizziness, blurred vision, headache, symptoms of urticarial and retinopathies (Cabral, 2010).

Due to the increasing resistance to antimalarial drugs such as chloroquine, quinine and mefloquine there was a rise in the number of cases in some tropical countries and this fact has been a threat to the local health system. Based on this assumption new drugs have been tested worldwide with the goal of which is preventing *P. falciparum*, resistance. Among these drugs, arthemether associated to lumefantrine was approved, for use in over 80 countries, causing no serious effects in 99% of patients who are carriers of malaria caused by *P. falciparum*, the other 1% had cough, diarrhea, vomiting and anemia (Pineiro, 2008). Among the newer drugs for malaria control is artemisinin and its derivatives. They act quickly in the destruction of blood schizont preventing the formation of gametocytes, and such derivatives are generally used in combination with other long half-life drug, including mefloquine, piperaquine, amodiaquine, lumefantrine, forming a set of combination therapies established by Artemisinin Combined Therapy (ACT) (Teófilo, 2008).

Another drug therapy scheme used in several countries is the combination of sulfadoxine and pyrimethamine. However, the levels of resistance to this drug increased and are associated with mutations in two genes: DHPS and DHFR (Teófilo, 2008).

The mefloquine is another drug used to combat *P. falciparum* resistant to chloroquine. However, this drug has some side effects such as gastrointestinal complications, dizziness and psychological effects, and even these effects being temporary, its use is not recommended to treat patients with history of epilepsy or psychiatric disorders (França, 2008).

We can also cite derivatives of the phenanthrene, and amodiaquine, hydroxyl-chloroquine as drugs used for the treatment of malaria caused by *P. falciparum* strains resistant to chloroquine (CRS). However, they are less effective than drugs mentioned above and more toxic than chloroquine, wherein similar effects are also observed with halofantrine, besides the occurrence of cross-resistance to mefloquine (Franca, 2008).

For the malaria control is necessary that new compounds and an effective vaccine are developed. Within this context research is being done based on empirical knowledge of traditional populations of the Brazilian Amazon region to search for new antimalarial drugs.

Antimalarial Ethnopharmacology

76 plant species of the Amazon were found with possible antimalarial activity, being distributed in 32 botanical families. Among the plants studied, 26 species belonging to 12 families, showed activity Anti-*Plasmodium falciparum* in vitro, by their crude extracts, fractions and isolated secondary metabolites, and 66 compounds were active against strains: 3D7, W2, FcB1, K1, Dd2, D2, D6, F32, FcM29 and Nigerian strains of *P. falciparum*.

Anti-*P. falciparum* activity of extracts and fractions

Chloroquine-sensitive strains

The *P. falciparum* 3D7 strain, which had its genome sequenced in 2002 (Gardner et al., 2002) is a chloroquine-sensitive strain (CSS), as well as D6 and F32 strains.

In the present study, 10 extracts and 2 fractions were found (with activity against 3D7 strain) prepared from 11 species belonging to five families, as can be seen in Table 1.

Table 1. Anti-*P. falciparum* activity (3D7 strain) of extracts and fractions of Amazonian plants (Brandão et al., 1997; Okunade & Lewis, 2004; Kvist et al., 2006; Dolabela, 2007; Mariath et al., 2009; Dolabela et al., 2008; Hurtado, 2013; Borges et al., 2013; De Paula, 2014).

Family	Specie	Sample	Antiplasmodial activity (µg/ml)
Apocynaceae	<i>Aspidosperma rigidum</i>	Stem(dichloromethane)	1,0
		Extract	***
	<i>Aspidosperma spruceanum</i>	Stem(dichloromethane)	6,0
		Extract	***
	<i>Aspidosperma parvifolium</i>	Bast (ethanol)	20,5
		Extract	**
	<i>Aspidosperma cylindrocarpon</i>	Core (ethanol)	39,0
		Extract	**
	<i>Aspidosperma excelsum</i>	Bast (ethanol)	42,0
Extract		**	
<i>Aspidosperma rigidum</i>	Stem (ethanol)	48,0	
	Extract	**	
<i>Aspidosperma spruceanum</i>	Stem (ethanol)	100,0	
	Extract	*	
Asteraceae	<i>Bidens pilosa</i>	Leaves and root (butanol) Fraction	50,0 **
Celastraceae	<i>Maytenus guyanensis</i>	Bast (hexano) Fraction	0,3 ***
Rutaceae	<i>Esenbeckia febrifuga</i>	Stem (ethanol) Extract	21,0 **
Verbenaceae	<i>Lantana cujabensis</i>	Leaves and root (ethanol) Extract	23,3 **

IC₅₀: Inhibitory concentration for 50% of the test population: low activity *(IC₅₀>100); moderate activity ***(10<IC₅₀>100); high activity ***(IC₅₀≤10).

The samples that produced the best results were the *Maytenus guyanensis* (bast) hexane extract and the *A. rigidum* (stem) ethanol extract.

Activity against *P. falciparum* strains observed in studies using species of the genus *Maytenus*, where the aqueous and methanol extracts of *M. undata*, showed an IC₅₀<10µg/ml, both for D6 (CSS) and W2 (CRS) (Muthaura et al., 2007). It is believed that the antiparasitic action of species of this genus is mainly due to the occurrence of friedelane triterpenes (Muhammad et al., 2000), like 3-oxo-friedelane, 3β-hydroxyfriedelane, 3-oxo-16β-hydroxyfriedelane that were isolated from *M. guyanensis* (Lima et al., 2013; Hurtado, 2013) and other species from the same genus (Nozaki et al., 1986).

The *A. rigidum* specie, belongs to Apocynaceae family, which is widely quoted in fever and malaria treatments (Brandão et al., 1992, Oliveira et al., 2011, Coutinho et al., 2013), also being cited with antibacterial action against *Escherichia coli* (Meneses-Pereira et al., 2006) and antileishmanial activity (Tanaka et al., 2007; Ferreira et al., 2004). The

following alkaloids of genus *Aspidosperma* have been isolated: β - yohimbine (OH-17em β), 10-methoxygeissoschizol, ramiflorines A and B (Marques et al., 1996; Oliveira et al., 2009) and isositsiriquina (Oliveira et al., 2001), which in combination or in isolation may be responsible for the antiparasitic action of the species.

The antiplasmodial action was assessed with the species *A. megalocarpon* and *A. oblongum*, against F32 and D6 strains, respectively. The methanol extract of *A. megalocarpon*, showed a moderate result, $IC_{50}=25,0\mu\text{g/mL}$ (Weniger et al., 2001), and high action against D2 (CRS), and for this species were also tested for antiplasmodial action these metabolites: aspidolimidine, aspidoalbina and fendlerine (Mitaine et al., 1998), The results and discussion of these metabolites are shown in the "Anti-*P. falciparum* activity of secondary metabolites" topic. The best ethanol extract of *A. oblongum*, presented high antiplasmodial action with $IC_{50}=0,85\mu\text{g/mL}$ (Cabral et al., 1993). This species also presented the best results against the W2 strain, detailed in Table 2 and discussed in the following section.

Chloroquine-resistant strains

The W2 and FcB1 strains of *P. falciparum* (CRS), are used to search for effective drugs against resistant strains, especially chloroquine.

It was found 10 extracts and one fraction (with activity against W2 strain) prepared from nine species belonging to four plant families. Against the FcB1 strain, two extracts and twelve fractions were prepared from five species belonging to four plants species, as can be seen in Table 2.

Table 2. Anti-*P. falciparum* activity (W2 and FcB1 strains) of extracts and fractions of Amazonian plants (Cabral et al., 1993; Sanaiotti et al., 1997; Miranda, 2000; Miranda & Absy, 2000; Okunade & Lewis, 2004; Carvalho, 2007; Dolabela, 2007; Mesquita et al., 2007; Dolabela et al., 2008; Mariath et al., 2009; Oliveira, 2012; De Paula, 2014; Meneguetti et al., 2014).

Family	Specie	Sample	Antiplasmodial activity ($\mu\text{g/ml}$)	
			W2	FcB1
Annonaceae	<i>Xylopia aromática</i>	Core of the root (hexane) Fraction	—	4,7 ***
	<i>Xylopia aromática</i>	Bark of the root (hexane) Fraction	—	6,8 ***
	<i>Xylopia aromática</i>	Bast (hexane) Fraction	—	15,3 **
	<i>Aspidosperma macrocarpon</i>	Bark of the root (ethanol) Extract	—	4,9 ***
Apocynaceae	<i>Aspidosperma oblongum</i>	Bast (ethanol)	4,7	—

		Extract	***	
	<i>Aspidosperma spruceanum</i>	Stem (dichloromethane) Extract	6,0 ***	—
	<i>Aspidosperma rigidum</i>	Stem (dichloromethane) Extract	19,7 **	—
	<i>Aspidosperma parvifolium</i>	Bast (ethanol) Extract	32,8 **	—
	<i>Aspidosperma rigidum</i>	Stem (ethanol) Extract	36,5 **	—
	<i>Aspidosperma cylindrocarpon</i>	Core (ethanol) Extract	44,0 **	—
	<i>Aspidosperma spruceanum</i>	Stem (ethanol) Extract	65,0 **	—
Bignoniaceae	<i>Anemopaegma arvense</i>	Root (hexane) Fraction	—	16,1 **
	<i>Anemopaegma arvense</i>	Leaf (hexane) Fraction	—	24,3 **
	<i>Cybastax antisiphilitica</i>	Core (hexane) Fraction	—	26,5 **
	<i>Anemopaegma arvense</i>	Bast (hexane) Fraction	—	27,6 **
Celastraceae	<i>Maytenus guyanensis</i>	Ethyl acetate (hexane) Fraction	56,6 **	—
Rutaceae	<i>Esenbeckia febrifuga</i>	Stem (ethanol) Extract	15,5 **	—
Salicaceae	<i>Casearia sylvestris</i>	Bast (hexane) Fraction	—	0,9 ***
	<i>Casearia sylvestris</i>	Bast (hexane) Fraction	—	1,0 ***
	<i>Casearia sylvestris</i>	Bark of the root (hexane) Fraction	—	1,2 ***
	<i>Casearia sylvestris</i>	Leaf (hexane) Fraction	—	1,3 ***
	<i>Casearia sylvestris</i>	Core of the root (hexane) Fraction	—	2,3 ***
	<i>Casearia sylvestris</i>	Bark of the root (ethanol) Extract	—	7,7 ***
Verbenaceae	<i>Lantana cujabensis</i>	Leaf and stem (ethanol) Extract	14,7 **	—

IC₅₀: Inhibitory concentration for 50% of the test population: low activity *(IC₅₀>100); moderate activity *(10<IC₅₀>100); high activity *** (IC₅₀≤10).

The *A. oblongum* and *A. spruceanum* species, as well as the others of Apocynaceae family, presented mainly alkaloids among its secondary metabolites, and among these we may mention the *A. oblongum* species: 10-methoxy-17-epi alloyohimbine, 19,20-dehydro-P-yohimbine, 3,4-dehydro-β yohimbine, p-yohimbine oxindole, p-yohimbine pseudoindoxyle, pyohimbine N-oxide, 10-methoxy-P-yohimbine, 10-methoxy-a-yohimbine, 19,20-dehydro-a-yohimbine, aricine pseudoindoxyle, methoxy antirhine, 10-methoxy sitsirikine, tetrahydro-sitsirikine (Robert et al., 1983) and for *A. spruceanum* specie: spruceanumines A, spruceanumines B, aspidospermidine, demethoxypalosine, aspidocarpine, aspidolimine, fendlerine, aspidolimidine, obscurinervidine e obscurinervine (Oliveira et al., 2009). It is

believed that the mixture of these metabolites are responsible for the antimalarial activity against W2 strain.

The best results against the FcB1 strain, were obtained from different fractions of *C. sylvestris*, which is characterized by the presence of substances of interest such as: coumarins, flavonoids, lignans and several diterpenes (Yamagushi et al., 2011). Beyond the antimalarial activity (Mesquita et al., 2007), also presents action against *Leishmania donovani* promastigotes, *Trypanosoma cruzi* amastigotes (Espíndola et al. 2004, Mesquita et al. 2005), *Aedes aegypti* larvae (Rodrigues et al., 2006) and antimicrobial action against fungi: *Aspergillus niger*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *C. tropicalis* and bacteria: *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella enteritidis* (Ferreira et al., 2011).

Other chloroquine-resistant strains were used, besides W2 and FcB1, such as: D2, Dd2, K1, FcM29 e Nigerian Strains, in studies against *P. falciparum* in vitro. The results of extracts and fractions of Amazonian plants against these strains are shown in Table 3.

Table 3. Anti-*P. falciparum* activity (D2, Dd2, K1 and Nigerian Strains) of extracts and fractions of Amazonian plants (Cabral et al., 1993; Mitaine et al., 1998; Weniger et al., 2001; Mitaine-Offer et al., 2002; Amarante et al., 2011; Silva et al., 2013; De Paula, 2014).

Family	Specie	Sample	Antiplasmodial activity ($\mu\text{g/ml}$)			
			D2	Dd2	K1	Nigerian Strains
Apocynaceae	<i>Aspidosperma megalocarpon</i>	Bast (methanol) Extract	8,0 ***	—	—	—
	<i>Aspidosperma ulei</i>	Bast (ethanol) Extract	—	—	17,6 **	—
	<i>Aspidosperma megalocarpon</i>	Bast (methanol) Extract	—	—	—	57,3 **
Araceae	<i>Montrichardia linifera</i>	Stem (dichloromethane) Fraction	—	<10 ***	—	—
	<i>Montrichardia linifera</i>	Stem (methanol) Fraction	—	<10 ***	—	—
	<i>Montrichardia linifera</i>	Stem (ethanol) Extracto	—	10<IC ₅₀ <100 **	—	—
	<i>Montrichardia linifera</i>	Stem (ethyl acetate) Fraction	—	10<IC ₅₀ <100 **	—	—
	<i>Montrichardia linifera</i>	Stem (hexane) Extract	—	>100,0 *	—	—
	<i>Montrichardia linifera</i>	Stem (hexane) Fraction	—	>100,0 *	—	—
Gentianaceae	<i>Tachia grandiflora</i>	Root (Chloroform) Fraction	—	—	10,5 **	—
	<i>Tachia grandiflora</i>	Leaves (Chloroform) Fraction	—	—	35,8 **	—

IC₅₀: Inhibitory concentration for 50% of the test population: low activity *(IC₅₀>100); moderate activity ** (10<IC₅₀<100); high activity *** (IC₅₀≤10).

The plant species presenting high antiplasmodial activity were *A. megalocarpon* and *M. linifera*, both had some secondary metabolites tested, as described and discussed in the following topic. The leaves from *M. linifera* presented alkaloids and triterpenes, substances suggested as the responsible for the antiplasmodial activity (Basco et al., 1994; Costa et al., 2009).

Anti-*P. falciparum* activity of secondary metabolites

Importantly, both the above data, against CRS and CSS, were obtained from extracts and fractions, and these results can theoretically be potentiated with isolation of secondary metabolites of these plants. Some research groups are making efforts for the isolation of these substances in order to obtain a drug with enhanced antiplasmodial activity and less likely to cross-action interactions and toxic effects. On the other hand, there are some difficulties in working with these metabolites, like in obtaining the amount that often is insufficient for the *in vivo* tests, as well as performing the *in vitro* tests, due to the difficult solubility of these compounds, which often occurs fully on toxic solvents to the culture media.

Some results of secondary metabolites isolated from plants of the Brazilian Amazon are shown in Table 4 and Figure 1.

The most promising results were presented by the following metabolites: neosergeolide, aspidocarpine, elipticina, simalikalactone D and orinocinolide, isolated from the species: *Picrolemma sprucei*, *Aspidosperma desmanthum*, *Aspidosperma vargasii*, *Quassia amara* and *Simaba orinocensis* respectively, all of them presenting action against CRS.

The neosergeolide, simalikalactone D and orinocinolide metabolites belongs to the triterpenes quassinoids group, which constitute a class of substances found almost exclusively in plants of Simaroubaceae family (Almeida et al., 2007).

Table 4. Anti-*P. falciparum* activity (3D7, FcM29, K1, W2 and Nigerian Strains) of secondary compounds isolated from Amazonian plants (Amorim et al., 1986; Amorim et al., 1988; Mitaine et al., 1998; Mitaine-Offer et al., 2002; Muhammad et al., 2004; Dolabela, 2007; Almeida et al., 2007; Bertania et al., 2006; Andrade-Neto, 2007; Dolabela et al., 2008; Calderon et al., 2009; Passemar et al., 2011; De Paula, 2014; Chierrito et al., 2014).

Family	Specie	Sample	Atividade antiplasmodica (µg/ml)				Nigerian Strains
			3D7	FcM29	K1	W2	
Apocynaceae	<i>Aspidosperma desmanthum</i>	Aspidocarpine (Figure 1.A)	—	—	0,007 ***	—	—
	<i>Aspidosperma megalocarpon</i>	Fendlerine (Figure 1.B)	—	25,6 **	—	—	—
	<i>Aspidosperma megalocarpon</i>	Aspidolimidine (Figure 1.C)	—	—	—	—	28,0 **
	<i>Aspidosperma megalocarpon</i>	Aspidoalbina (Figure 1.D)	—	59,2 **	—	—	—
	<i>Aspidosperma oblongum</i>	Usambarensin (Figure 1.E)	—	0,23 ***	—	—	—
	<i>Aspidosperma oblongum</i>	Ochrolifuanin A (Figure 1.F)	—	0,47 ***	—	—	—
	<i>Aspidosperma parvifolium</i>	Uleine (Figure 1.G)	—	—	—	0,75 ***	—
	<i>Aspidosperma parvifolium</i>	Uleine (Figure 1.G)	11,9 **	—	—	—	—
	<i>Aspidosperma ulei</i>	20-epi-dasycarpidone (Figure 1.H)	—	—	—	4,5 ***	—
	<i>Aspidosperma vargasii</i>	Ellipticine (Figure 1.I)	—	—	—	0,018 ***	—
	Piperaceae	<i>Montrichardia linifera</i>	4-Nerolidylcatechol (Figure 1.J)	—	—	0,21 ***	—
Rutaceae	<i>Esenbeckia febrifuga</i>	Skimmiamine (Figure 1.K)	—	—	—	75,3 **	—
	<i>Esenbeckia febrifuga</i>	Rutaevine (Figure 1.L)	—	—	—	>100,0 *	—
	<i>Esenbeckia febrifuga</i>	Rutaevine (Figure 1.L)	>100,0 *	—	—	—	—
	<i>Esenbeckia febrifuga</i>	g-Fagarine (Figure 1.M)	109,8 *	—	—	—	—
	<i>Esenbeckia febrifuga</i>	g-Fagarine (Figure 1.M)	—	—	—	157,2 *	—
	<i>Esenbeckia febrifuga</i>	Skimmiamine (Figure 1.K)	166,0 *	—	—	—	—
	<i>Esenbeckia febrifuga</i>	Flindersiamine (Figure 1.N)	265,6 *	—	—	—	—
Simaroubaceae	<i>Esenbeckia febrifuga</i>	Flindersiamine (Figure 1.N)	—	—	—	348,0 *	—
	<i>Picrolemma sprucei</i>	Neosergeolide (Figure 1.O)	—	—	0,001 ***	—	—
	<i>Quassia amara</i>	Simalikalactone D (Figure 1.P)	—	—	—	0,037 ***	—
	<i>Simaba orinocensis</i>	Orinocinolide (Figure 1.Q)	—	—	—	0,085 ***	—

IC₅₀: Inhibitory concentration for 50% of the test population: low activity *(IC₅₀>100); moderate activity ***(10<IC₅₀>100); high activity ****(IC₅₀≤10).

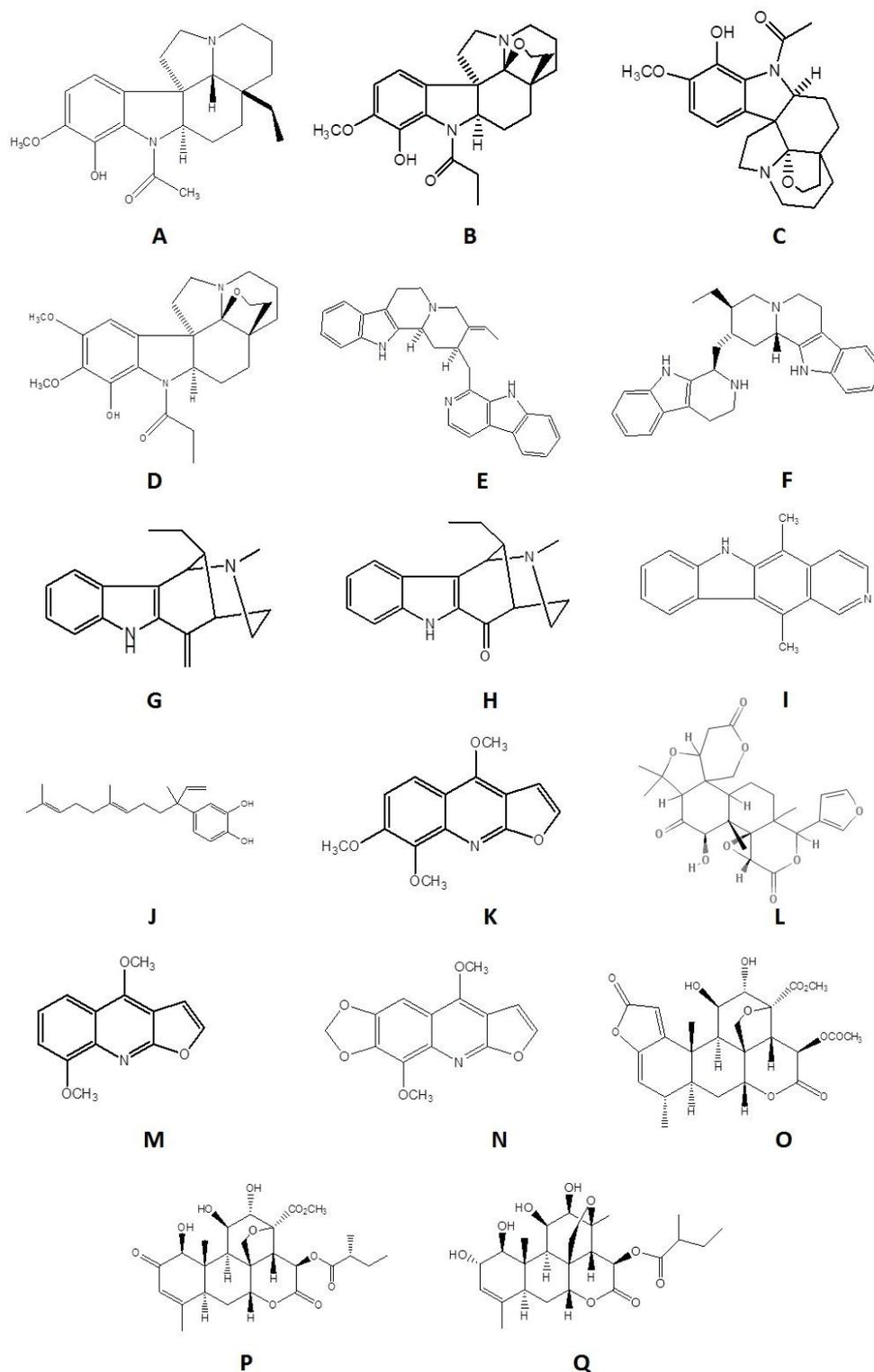


Figure 1. chemical structure of secondary compounds isolated from Amazonian plants with activity *Anti-P. falciparum*. A) Aspidocarpine; B) Fendlerine; C) Aspidolimidine; D) Aspidoalbine; E) Usambarensin; F) Ochrolifuanin A; G) Uleine; H) 20-epi-dasycarpidone; I) Ellipticine; J) 4-Nerolidylcatechol; L) Rutaevine; M) g-Fagarine; N) Flindersiamine; O) Neosergeolide; P) Simalikalactone D; Q) Orinocinolide.

The quassinoids are considered chemically triterpenes biodegradable with high standard oxygenation, presenting a wide range of biological activity (Polonsky & Fortschr, 1985), as: antiviral (Apers et al., 2002), anthelmintic (Nunomura et al., 2006) and antimalarial (Andrade-Neto, 2007), being these metabolites known by inhibiting growth of *P. falciparum* in vitro at nanomolar concentrations, having the IC₅₀ three times lower than chloroquine and quinine on the inhibition of *P. falciparum* and five times lower against *P. berghei*. They also demonstrate better inhibition in vivo (rodents) than chloroquine and artemisinin. However, typically they induce toxicity due primarily to inhibition of protein synthesis (Fandeur et al., 1985; Kuo et al. 2004; Muhammad et al., 2004; Andrade-Neto, 2007; Silva et al., 2009).

The other two metabolites which had IC₅₀ <0.1 µg/mL were alkaloid ellipticine and aspidocarpoine.

The aspidocarpine and ellipticine metabolites, which are indolic alkaloids, exhibit a wide range of biological activities beyond antiplasmodial, antimicrobial, antibacterial and cytotoxic action, the latter being responsible for ellipticine to become one of the most studied indolic alkaloid eventually being used in clinical trials of cancer treatment (Mitaine et al., 1998; Pedersen et al., 2005; Endress et al., 2007).

The *M. linifera* and *A. oblongum* species have potentiated their results with the isolation of the metabolites 4-nerolidylcatechol, usambare and ochrolifuni, in where the best IC₅₀ results of fractions and extracts ranged between 4,0-10µg/mL, while the isolated compounds IC₅₀ ranged between 0,21 and 0,47µg/mL, both tested against CRS, showing the importance of the isolation of substances to the search for new drugs. On the other hand *A. megalocarpon*, had its action reduced with the isolation of metabolites fendlerine, aspidolimidine e aspidoalbina, once its metanol extract showed an IC₅₀=8,0µg/mL, and the isolated compound IC₅₀ between 25,6 and 59,2µg/mL all tested against CRS, demonstrating that in this species the good activity of the extract may be related with the interaction between the different alkaloids or that the main antiplasmodial metabolite was not isolated and/or tested.

Besides the species with verified data of action against *P. falciparum* others are cited by traditional populations in antimalarial, antifever and antiparasitic, such as: Apocynaceae: *A. album*, *A. auriculatum*, *A. cuspa*, *A. discolor*, *A. sandwithianum*, *A. schultesii*, *A. tomentosum*; Apocynaceae: *Himatanthus sucuuba*; Asteraceae: *Ageratum conyzoides*; Bixaceae: *Bixa orellana*; Clusiaceae: *Mammea americana*; Compositae: *Acanthospermum australe*, *Pluchea sagitalis*, *Spilantes oleracea*, *Vernonia condensata*; Convolvulaceae:

Calycobolus sp; Euphorbiaceae: *Croton cajucara*, *C. lechleri* *Euphorbia papillosa*; Fabaceae: *Bowdichia* sp, *Erythrina* sp, *Senna occidentalis*, *S. alata*, *S. spruceana*; Guttiferae: *Vismia japurensis*; Labiatae: *Leonotis nepetaefolia*, *Ocimum* sp; Leguminosae: *Bauhinia rutilans*, *Desmodium aakendens*; Malpighiaceae: *Banisteriopsis caapi*, Malvaceae: *Gossypium herbaceum*, *Sida spinosa*; Meliaceae: *Carapa guianensis*; Menispermaceae: *Abuta concolo*, *A. grandifolia*; Moraceae: *Ficus* sp; Nyctaginaceae: *Boerhavia hirsuta*; Piperaceae: *Piper glabratum*, *P. acutifolium*, *P. callosum*; Poycynaceae: *Geissospermum sericeum*; Portulacaceae: *Portulaca pilosa*; Rhamnaceae: *Ampelozizyphus amazonicus*; Rubiaceae: *Coutarea hexandra*, *Cinchona* sp, *Remijia* sp, *Psychotria viridis*; Solanaceae: *Physajis brasiliensis*. These species are indicated for antiplasmodial action studies of its extracts, fractions and isolates (Di Stasi, 2002; Lee & Coll, 2002; Andrade-Net et al., 2003; Barbosa et al., 2003; Quignard et al., 2003; Berg, 2010; Araújo Jr et al., 2007; Flores et al., 2008; Calderon et al., 2009; Fão et al., 2012; Bezerra et al., 2012).

FINAL CONSIDERATIONS

It was found a great diversity of plant species in the Brazilian Amazon with potential for research of new herbal and secondary metabolites with antiplasmodial action, in addition to treating other neglected parasitic diseases. This review demonstrated that future studies should be directed to species that present the quassinoids triterpene metabolites and indole alkaloids, that showed the best actions anti-*P. falciparum*. However, for these studies is necessary, in addition to financial support, the interaction between different laboratories and research groups for the formation of multidisciplinary and interdisciplinary teams, because this would increase the level of research and maximize the probability of discovery of new antimalarial drugs.

RESUMO

Etnofarmacologia antimalárica na Amazônia Brasileira

Está cada vez maior a necessidade em se buscar novos fármacos para o tratamento da malária, principalmente devido à resistência do parasito, o que é uma ameaça ao controle da doença. O presente estudo descreve uma revisão bibliográfica sobre a etnofarmacologia antimalárica (*Anti-Plasmodium falciparum* - *in vitro*) de plantas da Amazônia brasileira. Constatou-se uma grande diversidade de espécies vegetais na Amazônia brasileira com potencial para a investigação de novos fitoterápicos e metabólitos secundários com ação antiplasmodial, além do tratamento de outras parasitoses negligenciadas. Porém, para a realização desses estudos são necessários além de apoio financeiro, a interação entre diferentes laboratórios e grupos de pesquisa para

a formação de equipes multidisciplinares e interdisciplinares, o que irá potencializar o nível da pesquisa na região e aumentar a probabilidade de descoberta de novos fármacos antimaláricos.

Palavras-chave: Plasmodium falciparum. Quimioterapia. Etnofarmacologia

REFERENCES

Alencar FE, Cerutti CJ, Durlacher RR, Boulos M, Alves FP, Milhous W, Pang LW. Atovaquone and proguanil for the treatment of malaria in Brazil. 1997;175(6):1544-1547.

Almeida MMB, Arriaga AMC, Santos AKL, Lemos TLG, Braz-Filho R, Vieira IJC. Ocorrência e atividade biológica de quassinóides da última década. Quim Nova. 2007;30(4): 935-951.

Amarante CB, Müller AH, Póvoa MM, Dolabela MF. Estudo fitoquímico biomonitorado pelos ensaios de toxicidade frente à *Artemia salina* e de atividade antiplasmódica do caule de aninga (*Montrichardia linifera*). Acta Amaz. 2011;41(3):431-434.

Amorim CZ, Flores CA, Gomes BE, Marques AD, Cordeiro RSB. Screening for antimalarial activity in the genus *Pothomorphe*. J Ethnopharmacol. 1988;24:101-106.

Amorim CZ, Gomes BE, Flores CA, Cordeiro RSB. Antimalarial activity screening from plants of the genus *Pothomorphe*. Braz J Med Biol Res. 1986;19:569A.

Andrade-Neto VF, et al. In vitro inhibition of *Plasmodium falciparum* by substances isolated from Amazonian antimalarial plants. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007;102(3):359-365,

Andrade-Neto VF, Brandão MG, Stehmann JR, Oliveira LA, Krettli AU. Antimalarial activity of *Cinchona-like* plants used to treat fever and malaria in Brazil. J Ethnopharmacol. 2003;87(2-3):253-256.

Apers S, et al. Antiviral activity of simalikalactone D, a quassinoid from *Quassia africana*. Planta Med. 2002;68(1):20-24.

Araújo-Jr JX, Antheaume C, Trindade RCP, Schmitt M, Bourguignon JJ, Sant'Ana AEG. Isolation and characterisation of the monoterpene indole alkaloids of *Aspidosperma pyriformium*. Phytochem Rev. 2007;6(1):183-188.

Ariey F, et al. A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. Nature. 2014;505(7481):50-55.

Barbosa WLR, Tavares ICC, Soares DC. Alcalóides de *Aspidosperma auriculatum* Standl. Braz J Pharmacogn. 2003;13(supl.1):6-8.

Basco LK, et al. *In vitro* activities of furoquinoline and acridone alkaloids against *Plasmodium falciparum*. Antimicrob Agents Ch. 1994;38(5):1169-1171.

Berg MEVD. Plantas medicinais na Amazônia: contribuição ao seu conhecimento sistemático. 3 ed. Museu Paraense Emílio Goeldi, 2010.

Bertania S, et al. Simalikalactone D is responsible for the antimalarial properties of an Amazonian traditional remedy made with *Quassia amara* L. (Simaroubaceae). J Ethnopharmacol. 2006;108(1):155-157.

Bezerra WS, Meneguetti DUO, Camargo LMA. A Busca de fármacos para tratamento da Tripanossomíase Americana: 103 anos de negligência. Rev Saúde. 2012;38(1):09-20.

- Bolzani MS, Bolzani VS. Do Peru à Java: A trajetória da quinina ao longo dos séculos. [Internet]. [Accessed in 01/10/2013]. Available in <http://www.s bq.org.br/filiais/adm/Upload/subconteudo/pdf/Historias_Interessantes_de_Produtos_Naturais04.pdf>.
- Borges CC, Matos TF, Moreira J, Rossato AE, Zanette VC, Amaral PA. *Bidens pilosa* L. (Asteraceae): traditional use in a community of southern Brazil. *Rev bras plantas med.* 2013;15(1):34-40.
- Brandão MGL, Grandi TSM, Rocha EMM, Sawyer DR, Krettli AU. Survey of medicinal plants used as antimalarials in the Amazon. *J Ethnopharmacol.* 1992;36(2):175-182.
- Brandão MGL, Krettli AU, Soares LSR, Nery CGC, Marinuzzi HC. Antimalarial activity of extracts and fractions from *Bidens pilosa* and other *Bidens species* (Asteraceae) correlated with the presence of acetylene and flavonoid compounds. *J Ethnopharmacol.* 1997;57:131-138.
- Brasil P, Daniel-Ribeiro CT. Malária: número de casos cai no Brasil, mas ainda chega a 300 mil ao ano. [Internet]. [Accessed in 20/03/2015]. Available in <<http://www6.ensp.fiocruz.br/visa/?q=node/2083>>.
- Cabral JA, McChesney JD, Milhous WK. A new antimalarial quassinoid from *Simaba guianensis*. *J Nat Prod.* 1993;56(11):1954-1961.
- Cabral MA. Anotações em farmacologia e farmácia clínica. [Internet]. [Accessed in 01/10/2013]. Available in <http://farmacolog.dominiotemporario.com/doc/Anotacoes_em_Farmacologia.pdf>.
- Calderon LA, et al. Amazonian biodiversity: a view of drug development for Leishmaniasis and malaria. *J Braz Chem Soc.* 2009;20(6):1011-1023.
- Carvalho PER. Cafezeiro-do-Mato. Embrapa Circular Técnica. 2007;138.
- Cechinel FV, Rosendo AY. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. *Quim Nova.* 1998;21(1):99-105.
- Chen N, et al. Origin and dissemination of chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* with mutant pfcrt alleles in the Philippines. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(5):2102-2105.
- Chierrito TPC, et al. Anti-malarial activity of indole alkaloids isolated from *Aspidosperma olivaceum*. *Malar J.* 2014; 13:142.
- Costa ESS, Dolabela MF, Póvoa M, Oliveira DJ, Müller AH. Estudos farmacognósticos, fitoquímicos, atividade antiplasmódica e toxicidade em *Artemia salina* de extrato etanólico de folhas de *Montrichardia linifera* (Arruda) Schott, Araceae. *Rev bras farmacogn.* 2009; 9(4): 834-838.
- COSTA AP, et al. Diagnóstico tardio de malária em área endêmica de dengue na extra-Amazônia Brasileira: experiência recente de uma unidade sentinela no estado do Rio de Janeiro. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2010;43(5):571-574.
- Coutinho JP, et al. *Aspidosperma* (Apocynaceae) plant cytotoxicity and activity towards malaria parasites. Part I: *Aspidosperma nitidum* (Benth) used as a remedy to treat fever and malaria in the Amazon. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2013;108(8): 974-982.

- De-Paula RC, Dolabela MF, De-Oliveira AB. *Aspidosperma* Species as Sources of Antimalarials. Part III. A Review of Traditional Use and Antimalarial Activity. *Planta Med.* 2014;80(5):378-86.
- Di-Stasi LC. *Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica*. 2 ed. Unesp, 2002.
- Dias LC, Dessoay MA. Quimioterapia da doença de chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. *Quím Nova.* 2009;32(9):2444-2457.
- Dobestyn FB, Phintuyothin P, Noeypatimanondh S, Teerakiarkamjorn S. Single dose therapy of falciparum malaria with mefloquine and pyrimethamine-sulfadoxine. *Bull World Health Organ.* 1979;57(2):275-278.
- Dolabela MF, et al. In vitro antiplasmodial activity of extract and constituents from *Esenbeckia febrifuga*, a plant traditionally used to treat malaria in the Brazilian Amazon. *Phytomedicine.* 2008;15(5):367-72.
- Dolabela MF. Atividade antiplasmódica e citotoxicidade de *Esenbeckia febrifuga* (A.ST-HIL) Juss. ex Mart. (Rutaceae) e de espécies do gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae). [Dissertation]. Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil, 2007.
- Endress ME, Bruyns PV. A revised classification of the Apocynaceae S.L. *The Bot Rev.* 2000;66(1):1-46.
- Espíndola LS, et al. Trypanocidal activity of a new diterpene from *Casearia sylvestris* Var. *Lingua*. *Planta Med.* 2004;70(11):1093-1095.
- Fandeur T, Moretti C, Polonsky J. In vitro and in vivo assessment of the antimalarial activity of sergeolide. *Planta Medica.* 1985;51:20-23.
- Fao F, Zan RA, Brondani FMM, Ramos LJ, Meneguetti DUO. Análise do potencial mutagênico da seiva da casca de *Croton lechleri* (Mull. Arg), no estado de Rondônia, Amazônia Ocidental. *SaBios.* 2012;7(1):91-98, 2012.
- Ferreira MS. Malária. In: Focaccia R. *Tratado de Infectologia*. Atheneu, 2005;1589-1632.
- Ferreira PMP, et al. Folk uses and pharmacological properties of *Casearia sylvestris*: a medicinal review. *An Acad Bras Ciênc.* 2011;83(4):1373-1384.
- Ferreira GM, Zan RA, Ramos LJ, Souza RAA, Meneguetti DUO. Panorama Epidemiológico da Malária no Município de Ariquemes, Rondônia, Amazônia Ocidental: Um Inquérito de Seis Anos (2005 a 2010). *Rev Reci.* 2012;2(4):128-132.
- Ferreira ICP, et al. Anti-leishmanial activity of alkaloidal extract from *Aspidosperma ramiflorum*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2004;99(3):325-327.
- Flores N, et al. Benzoic acid derivatives from Piper species and their antiparasitic activity. *J Nat Prod.* 2008;71(9):1538-1543.
- Fontanet AL, et al. High prevalence of mefloquine-resistant falciparum malaria in Eastern Thailand. *Bull World Health Organ.* 1993;71(3-4):377-383.
- França TCC, Santos MG, Figueroa-Villar, JD. Malária: aspectos históricos e quimioterapia. *Quím Nova.* 2008;31(5):1271-1278.
- Gardner MJ, et al. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature.* 2002;419(6906):498-511.
- Gomes AP, et al. Malária grave por *Plasmodium falciparum*. *Rev Bras Ter Intensiva.* 2011;23(3):358-369.

- Hélio AF, João FJ, Roger S. Resistência do *Plasmodium falciparum* ao fansidar, quinina e tetraciclina. Rev Saúde Pública. 1982;16(5):299-302.
- Hellemond, et al. Human *Plasmodium knowlesi* infection detected by rapid diagnostic tests for malaria. 2009;15(9):1478-1480.
- Hurtado FB. Contribuição ao estudo fotoquímico e atividade biológico da entrecasca de *Maytenus guianensis klotzsch* ex Reissek (Celastraceae). [Doctor's Theses]. Universidade Federal de Rondônia, Brasil, 2013.
- Kuo PC, Damu AG, Lee KH, Wu TS. Cytotoxic and antimalarial constituents from roots of *Eurycoma longifolia*. Bioorg Med Chem. 2004;12(3):537-544.
- Kvist LP, Christensen SB, Rasmussen HB, Mejia K, Gonzalez A. Identification and evaluation of Peruvian plants used to treat malaria and leishmaniasis. J Ethnopharmacol. 2006;106(3):390-402.
- Lee MR, Coll JR. Plants against malaria. Part 1: Cinchona or the Peruvian bark. Physicians Edinb. 2002;32(3):189-196.
- Lima RA, Hurtado FB, Silva GVJ, Militão JSLT, Facundo VA. Triterpenos friedelanos isolados do eluato hexânico da entrecasca de *Maytenus guianensis* (Celastraceae). In 64º Congresso Brasileiro de Botânica, 2013.
- Mariath IR, et al. Plants of the American continent with antimalarial activity. Rev Bras Farmacogn. 2009;19(1a):158-191.
- Marques MFS, et al. Indole alkaloid from *Aspidosperma ramiflorum*. Phytochemistry. 1996;41(3):963-967.
- Meneguetti DUO, et al. Atividade antiplasmodial da fração (acetato de etila) obtidos da entrecasca de *Maytenus guianensis* Klotzsch ex Reissek (Celastraceae), xixuá amazônico. In 50º Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2014.
- Meneses-Pereira M, Alcântara AFC, Pilo-Veloso D, Raslan DS. NMR structural analysis of braznitidumine: a new indole alkaloid with 1,2,9-triazabicyclo [7.2.1] system, isolated from *Aspidosperma nitidum* (Apocynaceae). J Braz Chem Soc. 2006;17(7):1274-1280.
- Mesquita M, et al. Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian Cerrado plants. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2005;100(7):783-787.
- Mesquita ML, Grellier P, Mambu L, de Paula JE, Espindola LS. In vitro antiplasmodial activity of Brazilian Cerrado plants used as traditional remedies. J Ethnopharmacol. 2007;110(1):165-170.
- Miranda IS. Análise florística e estrutural da vegetação lenhosa do Rio Comemoração, Pimenta Bueno, Rondônia, Brasil. Acta Amaz. 2000;30(3):393-422.
- Miranda IS, Absy ML. Fisionomia das Savanas de Roraima, Brasil. Acta Amaz. 2000;30(3):423-440, 2000.
- Mita T, Tanabe K. Evolution of *Plasmodium falciparum* drug resistance: implications for the development and containment of artemisinin resistance. Jpn J Infect Dis. 2012;65(6):465-475.
- Mitaine AC, Weniger B, Sauvain M, Lucumi E, Aragon R, Zeches-Hanrot M. Indole alkaloids from the trunk bark of *Aspidosperma megalocarpon*. Planta Med. 1998;64(5):487.

- Mitaine-Offer AC, Sauvain M, Valentin A, Callapa J, Mallie M, Zeches-Hanrot M. Antiplasmodial activity of *Aspidosperma indole* alkaloids. *Phytomedicine*; 2002;9(2):142-145.
- Monteiro MRCC, Fernandes SC, Ribeiro MC. Aspectos clínicos e epidemiológicos da malária em um hospital universitário de Belém, Estado do Pará, Brasil. *Rev Pan-Amaz Saude*. 2013;4(2):33-43.
- Muhammad I, et al. Bioactive 12- oleanene triterpene and secotriterpene acids from *Maytenus undata*. *J Nat Prod*. 2000;63(5):605-610.
- Muhammad I, et al. A new antimalarial quassinoid from *Simaba orinocensis*. *J Nat Prod*. 2004;67(5):772-777.
- Muthaura CN, et al. Antimalarial activity of some plants traditionally used in treatment of malaria in Kwale district of Kenya. *J Ethnopharmacol*. 2007;25;112(3):545-451.
- Nozaki H, et al. Antitumor triterpenes of *Maytenus diversifolia*. *Phytochemistry*. 1986;25(2):479-485.
- Nunomura RCS, et al. In vitro studies of the anthelmintic activity of *Picrolemma sprucei* Hook. f. (Simaroubaceae). *Acta Amaz*. 2006;36(3):327-330.
- Okunade AL, Lewis WH. *Oleanene constituents of Lantana cujabensis*. *Fitoterapia*. 2004;75(3-4):327-331.
- Oliveira DR, Costa A, Leitão GG, Castro NG, dos Santos JP, Leitão SG. Estudo etnofarmacognóstico da saracuramirá (*Ampelozizyphus amazonicus* Ducke), uma planta medicinal usada por comunidades quilombolas do Município de Oriximiná-PA, Brasil. *Acta Amaz*. 2011;41(3):383-392.
- Oliveira VB, Freitas MSM, Mathias L, Braz-Filho R, Vieira IJC. Atividade biológica e alcalóides indólicos do gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae): uma revisão. *Rev Bras Plantas Med*. 2009;11(1):92-99.
- Oliveira AJB, Koike L, Reis FAM, Shepherd SLK. Callus culture of *Aspidosperma ramiflorum* Muell. Arg.: growth and alkaloid production. *Acta Scient*. 2001;23(2):609-612.
- Oliveira VB. Potencial dos frutos de *Xylopia aromática* (Lam.) Mart. (Annonaceae) no tratamento de alterações metabólicas, induzidas por dieta em camundongos balb/c. [Dissertation]. Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil, 2012.
- Oliveira VB, et al. Spruceanumines A and B, novel plumeran indole alkaloids from *Aspidosperma spruceanum* (Apocynaceae). *J Braz Chem Soc*. 2009;20(4):753-759.
- Osorio-De-Castro CGS, et al. Conhecimentos, práticas e percepções de profissionais de saúde sobre o tratamento de malária não complicada. em municípios de alto risco da Amazônia Legal. *Ciênc Saúde Coletiva*. 2011;16(1):1445-1456.
- Passemar C, et al. Indole and aminoimidazole moieties appear as key structural units in antiplasmodial molecules. *Phytomedicine* 2011;18(13):1118-1125.
- Pedersen JM, Bowman WR, Elsegood MRJ, Fletcher AJ, Lovell PJJ. Synthesis of Ellipticine: A Radical Cascade Protocol to Aryl- and Heteroaryl-Annulated[b]carbazoles. *Org. Chem*. 2005;70(25):10615-10618.
- Pimentel LF, et al. Nanotecnologia farmacêutica aplicada ao tratamento da malária. *Braz Jour Pharmaceutical Sciences*. 2007;43(4):503-514.

- Pinheiro PNQ, et al. Aspectos farmacológicos do antimalárico lumefantrina. *Rev Para Med.* 2013;27(1):3532.
- Polonsky J, Fortschr. Quassinoid bitter principles II. *Chem Org Nat.* 1985;47:221-264.
- Pereira MM, Jácome RLRP, Alcântara AFC, Alves RB, Raslan DS. Alcalóides indólicos isolados de espécies do gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae). *Quim Nova.* 2007;30(4):970-983.
- Quignard ELJ, et al. Screening of plants found in Amazonas state for lethality towards brine shrimp *Artemia franciscana*. *Acta Amaz.* 2003;33(1):93-104.
- Reyes S, Passos ADC, Osanai CH. Resistência *in vivo* do *P. falciparum* às 4-aminoquinoleínas e à associação sulfadoxina-pirimetamina. I. Estudo de Porto Velho, Rondônia. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1985;18(3):175-181.
- Robert GMT, Ahond A, Poupat C, Potier P, Jacquemin H, Kan SK. *Aspidosperma* de Guyane: alcaloides des graines de *Aspidosperma oblongum*. *J Nat Prod.* 1983;46(5):708-722.
- Rodrigues AMS, De-Paula JE, Degallier N, Molez JF, Espíndola LS. Larvicidal activity of some Cerrado plant extracts against *Aedes aegypti*. *J Am Mosq Control Assoc.* 2006;22(2):314-317.
- Sá MS. Avaliação da atividade antimalárica de substâncias obtidas de espécies vegetais nativas ou endêmicas do semi-árido brasileiro e derivados sintéticos. [Doctor's Theses]. Fundação Oswaldo Cruz - Salvador, Brasil, 2011.
- Sabbatani S, Fiorino S, Manfredi R. Malária por *Plasmodium knowlesi* no Sudeste Asiático e na América: casos importados podem representar um alerta de saúde: *Plasmodium knowlesi* como o quinto parasita da malária. *AVFT.* 2009;28(2):48-50.
- Sanaiotti TM, Bridgewater S, Ratter JA. A floristic study of the savana vegetation of the state of Amapá, Brazil, and suggestions for its conservation. *Bol Mus Para Emílio Goeldi.* 1997;13(1):3-29.
- Santos FLA, et al. Pesquisa, desenvolvimento e inovação para controle das doenças negligenciadas. *Rev Ciênc Farm Básica Apl.* 2012;33(1):37-47.
- Santos FS. As plantas Brasileiras, os jesuítas e os indígenas do Brasil: história e ciência na trianga brasílica (séc. XVII-XVIII). Casa do Novo Autor, 2009.
- Scalercio SRRA. Estudo teórico do mecanismo redox de derivados quinolínicos na atividade antimalárica. [Dissertation]. Universidade Federal do Pará, 2010.
- Sidhu AB, Verdier-Pinard D, Fidock DA. Chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* malaria parasites conferred by pfcr1 mutations. *Science.* 2002;298(5591):210-213.
- Silva ECC, et al. Biological activity of neosergeolide and isobrucein B (and two semi-synthetic derivatives) isolated from the Amazonian medicinal plant *Picrolemma sprucei* (Simaroubaceae). *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009;104(1):48-56.
- Silva LFR, et al. In vitro and in vivo antimalarial activity and cytotoxicity of extracts, fractions and a substance isolated from the Amazonian plant *Tachia grandiflora* (Gentianaceae). *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2013;108(4):501-507.
- Silva THA, et al. Estudo de modelagem molecular de complexos ferriprotoporfirina-IX e quinolinocarbinolaminas antimaláricas: proposta de um farmacóforo. *Quím Nova.* 2005;28(2):244-249.

Sobrinho JL, Medeiros FPM, La Roca MF, Silva KR, Lima LNA, Neto PJR. Delineamento de alternativas terapêuticas para o tratamento da doença de Chagas. *Rev Patol Trop.* 2007;36(2):103-118.

Tanaka JCA, et al. Antileishmanial activity of indole alkaloids from *Aspidosperma ramiflorum*. *Phytomedicine.* 2007;16(6):377-380.

Teófilo VHM. Estudo da resistência aos antimaláricos sulfadoxina e pirimetamina em *Plasmodium falciparum* nas ilhas de São Tomé e Príncipe: origem das mutações pontuais nos genes DHFR e DHPS. [Dissertation]. Universidade de Lisboa, 2008.

Villalobos SJ, Camargo LMA, Braga MFV, Medeiros MPS, Macêdo VO. Avaliação da eficácia do artesunato associado à tetraciclina na terapêutica da malária falciparum. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1997;30(3):215-222.

Weniger B, et al. Antiprotozoal activities of Colombian plants. *J Ethnopharmacol.* 2001;78(2-3):193-200.

WHO. World Malaria Report. World Health Organization, 2014.

Yamagushi MQ, Gusman GS, Vestena S. Efeito alelopático de extratos aquosos de *Eucalyptus globulus* Labill. e de *Casearia sylvestris* Sw. sobre espécies cultivadas. *Semina: Ci Agrárias.* 2011;32(4):1361-1374.

ANEXOS II
Artigo Publicado na Revista Ciência e Natura

Análise Citotóxica e Mutagênica do Extrato Aquoso de *Maytenus guyanensis* Klotzsch Ex Reissek (Celastraceae) Chichuá (Xixuá) Amazônico

Analysis cytotoxic and mutagenic the Aqueous Extract of *Maytenus guyanensis* Klotzsch Ex Reissek (Celastraceae) Chichuá (Xixuá) Amazon

Dionatas Ulises de Oliveira Meneguetti¹, Renato Abreu Lima², Jaqueline Barbosa da Silva³,
 Ramaele Pereira da Silva⁴, Rubiani de Cassia Pagotto⁵, Valdir Alves Facundo⁶.

¹ Doutorando, Universidade Federal do Acre (UFAC), Rio Branco - Acre- Brasil

² Doutorando, Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal, Porto Velho - Rondônia - Brasil

^{3,4} Graduanda, Faculdades Integradas Aparício Carvalho, FIMCA, Porto Velho - RO - Brasil

⁵ Doutora, Departamento de Biologia, Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho - RO - Brasil

⁶ Doutor, Departamento de Química, Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho - RO - Brasil

Resumo

O gênero *Maytenus* é o maior da família Celastraceae com cerca de 225 espécies. *Maytenus guyanensis* é uma árvore endêmica de terra firme na Amazônia, e conhecida como chichuá, xixuá, chuchahuasi, chucchu huashu, chuchuasi e chuchasha. Suas raízes e caule são utilizados como analgésico, anti-inflamatório, afrodisíaco, relaxante muscular, antirreumático, antidiarreico e antiparasitário sendo também indicada no tratamento de artrite, impotência, resfriado, bronquite, hemorroidas e câncer. O presente estudo objetivou realizar uma análise citotóxica e mutagênica do extrato aquoso de *M. guyanensis*. Os métodos utilizados foram: índice mitótico, germinação dos meristemas e análise de micronúcleo em *Allium cepa*. Constatou-se que o extrato aquoso da entrecasca *M. guyanensis* nas concentrações de 3,85 e 38,5 mg/mL não apresenta ação citotóxica e mutagênica, e ainda atuam como anticitotóxico e antimutagênico. O tratamento de 77mg/mL demonstrou ter ação citotóxica, e anticitotóxica na presença de paracetamol, porém sem ação mutagênica e antimutagênica. A concentração de 192mg/mL demonstrou ser citotóxica e mutagênica. O estudo demonstrou a incolumidade em relação aos efeitos citotóxicos e mutagênicos no uso tradicional *M. guyanensis*, sendo indicados estudos futuros *in vitro* (linfócitos) e *in vivo* (camundongos) para uma melhor compreensão dos efeitos fisiológicos dos extratos e compostos isolados, e até mesmo para o desenvolvimento de um fitoterápico ou fármaco tendo esta espécie como matéria prima.

Palavras-chave: Citotoxicidade, Mutagenicidade, *Maytenus guyanensis*.

Abstract

The *Maytenus* genus is the largest in the Celastraceae family this comprises about 225 species. *Maytenus guyanensis* is an endemic tree of dry land in the Amazon, and known as chichuá, xixuá, chuchahuasi, chucchu Huashu, chuchuasi and chuchasha. Its roots and stems are used as analgesic, anti-inflammatory, aphrodisiac, muscle relaxant, antirheumatic, anti-diarrheal and anti-interference is also indicated for the treatment of arthritis, impotence, flu, bronchitis, hemorrhoids and cancer. This study aimed to perform a cytotoxic and mutagenic analysis of aqueous extract of *M. guyanensis*. The methods used were: mitotic index, germination of meristems and analysis of micronucleus in *Allium cepa*. It was found that the aqueous extract of *M. guyanensis* bark at concentrations of 3.85 and 38.5 mg / mL does not presented cytotoxic and mutagenic action, and also acted as anticitotóxico and antimutagenic. The treatment of 77mg/mL demonstrated to have effects cytotoxic and anticitotóxica in the presence of paracetamol, this concentration showed no mutagenic and antimutagenic action. The concentration of 192mg/mL was identified action cytotoxic and mutagenic. The study demonstrated the safety cytotoxic and mutagenic of use traditional of *M. guyanensis*. Future studies are indicated *in vitro* (lymphocytes) and *in vivo* (mice) for a better understanding of the physiological effects of extracts and isolated compounds for better conclusions on the safe use of the same, and even the development of a herbal drug or taking this species as raw material.

Keywords: Cytotoxicity, Mutagenicity, *Maytenus guyanensis*.

1 Introdução

A utilização de plantas com fins medicinais para tratamento, cura e/ou prevenção de doenças é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade (DUTRA, 2009). Os produtos naturais desempenham um papel importante na descoberta e desenvolvimento de novas entidades químicas como materiais de partida para a síntese de drogas mais específicas e eficientes (LANG et al., 2008). A flora brasileira possui ampla utilização pela população, mas existe o consenso da insuficiência de estudos científicos acerca do assunto (SILVA et al., 2012), principalmente se tratando da segurança e efetividade dos produtos naturais (BRASIL, 1996; FDA, 2008), sendo imprescindível a realização de testes toxicológicos e mutagênicos. Vários autores salientaram a importância e a utilidade de testes com vegetais na avaliação de riscos de genotoxicidade, pois apesar das diferenças entre os metabolismos de plantas e animais os resultados mutagênicos possuem alta compatibilidade (HURTADO, 2013; BAGATINI et al., 2007; FISKEJÓ, 1994).

Entre os modelos vegetais, o sistema teste *Allium cepa* apresenta-se como um bioindicador ideal para o primeiro screening da genotoxicidade de extrato de plantas medicinais, devido ao seu baixo custo, confiabilidade e concordância com outros testes de genotoxicidade (FÃO et al., 2012; POLETTI et al., 2011; BAGATINI et al., 2007), como observado por Teixeira et al. (2003) em extratos de *Psidium guajava* L. e *Achillea millefolium* L. em três sistemas testes: células meristemáticas de *A. cepa*, células da medula óssea de ratos e linfócitos humanos, sendo observado resultados antimutagênicos dessas espécies nos três sistemas testados, demonstrando a equivalência entre os mesmos.

O Brasil possui quase 19% da flora mundial, sendo a Floresta Amazônica, uma das mais ricas e diversificadas do mundo, onde cerca de 99% das plantas medicinais não têm sua eficácia e segurança farmacológica comprovada (GIULIETTI et al., 2005; FÃO et al., 2012).

A família Celastraceae é encontrada principalmente em regiões tropicais, estando representadas por 98 gêneros e aproximadamente 1.264 espécies, caracterizadas em seus habitats naturais como árvores, arbustos, trepadeiras e cipós (LORENZI & MATOS, 2008). No Brasil, os gêneros mais representativos da família Celastraceae são: *Maytenus* e *Salacia*, respectivamente (LIÃO, 1994). Muita atenção têm sido dada às espécies desta família, devido ao seu amplo leque de atividades biológicas descritos na literatura (FONSECA et al., 1997; LIÃO et al., 1997; RODRIGUES et al., 2006).

Maytenus guyanensis é uma árvore endêmica de terra firme na Amazônia, conhecida como chichuá, xixuá, chuchahuasi, chucchu huashu, chuchuasi e chuchasha (REVILLA, 2002; BORRÁS, 2003). Suas raízes e caule são utilizados como analgésico, anti-inflamatório, afrodisíaco, relaxante muscular, antireumático e antiarrítmico (BORRÁS, 2003). Como cosmético é utilizado nas erup-

ções cutâneas e prevenção de câncer de pele (REVILLA, 2002). O uso de antioxidantes naturais tem aumentado com as descobertas das propriedades dos componentes que são produzidos pelas plantas por meio do metabolismo secundário, devido a atuação como agentes redutores, sequestradores de radicais livres, quelantes de metais ou desativadores do oxigênio singlete e/ou exibir simultaneamente, mais de uma dessas funções (CANTERLE, 2005).

O presente estudo objetivou realizar uma análise citotóxica e mutagênica do extrato aquoso de *M. guyanensis*, com o intuito de averiguar a possível incolumidade do uso tradicional dessa espécie.

2 Material e métodos

2.1 Coleta e identificação do material vegetal

As entrecasas de *M. guyanensis* foram coletadas em fevereiro de 2008 na Reserva Florestal Adolpho Ducke, localizada no Km 26 da Estrada Manaus-Itacoatiara (AM-010) (Lat 02°53'20''S, Long 59°58'54''W). A identificação da espécie foi realizada no Herbário do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA), exsicata n° 188.485.

2.2 Preparo do extrato

A entrecasca de *M. guyanensis* foi triturada para aumentar a superfície de contato com o solvente. O extrato foi preparado por meio de maceração em H₂O mineral por 72 horas, nas seguintes concentrações: (3,85mg/mL) normalmente utilizada pela população, (38,5mg/mL) 10 vezes mais concentrada, (77mg/mL) 20 vezes mais concentrada e (192mg/mL) 50 vezes mais concentrada (CAMPAROTO et al., 2002).

2.3 Análise citotóxica e mutagênica

O experimento utilizou a espécie *Allium cepa*, (conhecida popularmente como cebola de cabeça) orgânica de tamanho uniforme, de mesma origem, não germinadas e saudáveis.

Em cada concentração e controles foram utilizadas 10 bulbos e *A. cepa*, sendo estes submersos para germinação em 50mL dos extratos em estudo a 24°C, durante 72 horas.

Foram utilizados os seguintes tratamentos: Controle Negativo (CN) contendo H₂O mineral e Controle Positivo (CP) contendo paracetamol diluído na concentração de 800mg/L, esta que é descrita como citotóxica e mutagênica (BESSEMS et al., 1995; STURBELLE et al., 2008; DÜSMAN et al., 2012). Para os testes citotóxicos e mutagênicos foi utilizado o CN e o extrato aquoso de *M. guyanensis* nas seguintes concentrações: 3,85mg/mL, 38,5mg/mL, 77mg/mL e 192mg/mL. Já para os testes anticitotóxicos e antimutagênicos foram utilizadas as

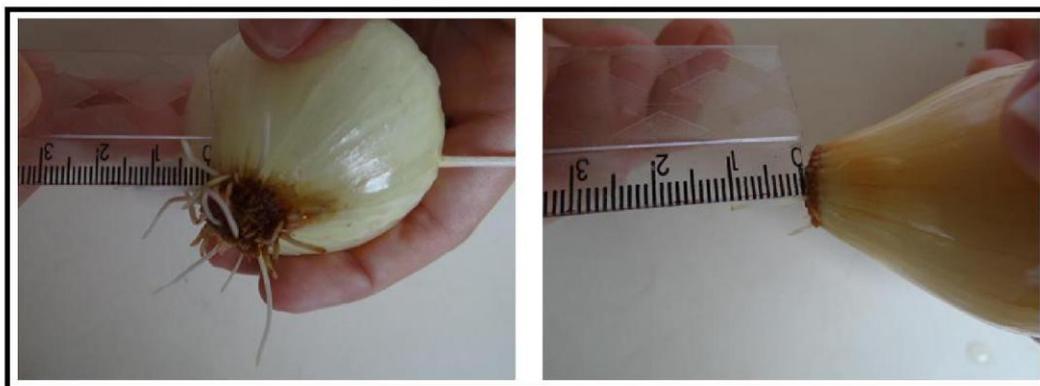


Figura 1. Medição das raízes de *A. cepa*.

mesmas concentrações do extrato aquoso de *M. guyanensis* descrito acima, adicionado do CP.

2.3.1 Análise Citotóxica

A análise citotóxica em *A. cepa* foi realizada com base na germinação dos meristemas (FISKESJÖ, 1985). As raízes foram medidas com 72 horas, após o início da germinação.

De cada bulbo de *A. cepa* foram medidas as três maiores raízes, totalizando 30 raízes por tratamento. A medição foi realizada com régua escolar simples graduada em cm (Figura 1).

2.3.2 Análise Mutagênica e Índice Mitótico

Em torno de 72h após o início do teste, os meristemas foram coletados com 0,1 a 2,5 cm de comprimento, lavados em água destilada, seguida de hidrólise com HCL 1N por 10 minutos em banho-maria a 60C°, sendo os tubos resfriados em água corrente.

Após nova lavagem dos meristemas hidrolisados em água destilada foram realizados esfregaços em duas lâminas por bulbo (totalizando 20 lâminas por tratamento), postas em seguida sob gelo seco por um minuto para retirada da lamínula e aguardado por 30 minutos

em temperatura ambiente para secagem. Em seguida, as mesmas foram coradas conforme Meneguetti et al. (2012), utilizando o kit Panótico Rápido composto de três recipientes: primeiro triarilmetano a 0,1%, segundo xantenos a 0,1% e terceiro tiazinas a 0,1%, sendo as lâminas submersas 10 vezes em cada recipiente com submersões de 1 segundo de duração na sequência descrita acima (OLIVEIRA; YAMASHITA; MENEGUETTI, 2013; FÃO et al., 2012; SILVA et al., 2012; POLETTO et al., 2011).

Posteriormente as lâminas foram lavadas em água deionizada com o pH 7,0 e secas em temperatura ambiente. Em cada lâmina foram contadas mil células e quantificado a quantidade de micronúcleos (Figura.2) e o percentual de células em interfase e mitose.

2.4 Análise estatística

Utilizou-se o software Graphad Prism 5.0 sendo aplicada a Análise de Variância (ANOVA) e o teste Tukey, sendo considerado significativo a partir de $P < 0,05$.

Para o cálculo de Índice Mitótico aplicou-se a seguinte equação: $(\text{Número Total de Células em Mitose} \div \text{Número Total de Células} \times 100)$.

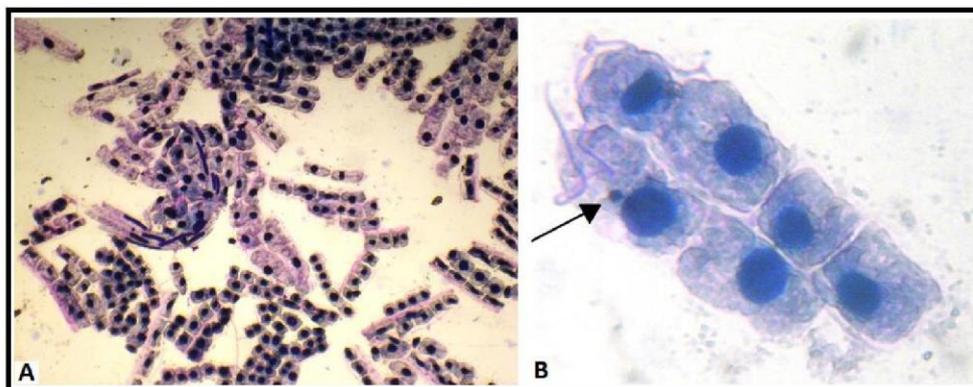


Figura 2. A – Células de *A. cepa*, aumento de 100X, B – Micronúcleo em célula de *A. cepa*, aumento de 400X (MENEGUETTI et al., 2012).

3 Resultados e discussão

Os resultados obtidos por meio das análises toxicológicas, antitoxicológicas, mutagênicas e antimutagênicas do extrato aquoso de *M. guyanensis*, são mostrados na Tabela 1.

Os dados mostram que o extrato aquoso de *M. guyanensis* apresenta ação citotóxica nas concentrações de 77 e 192mg/mL ($P<0,001$), (Tabela 1; Figura 3 a), o que não é preocupante visto que essas concentrações são, respectivamente, 20 vezes mais concentradas que a usualmente utilizadas pela população que é 3,85mg/mL (CAMPAROTO et al., 2002). Nas concentrações de 3,85 e 38,5mg/mL, os extratos apresentaram ação antitoxicológica ($P<0,001$), contra os efeitos ocasionado pelo paracetamol na concentração de 800mg/L conforme foi observado no CP (Figura 3 b). Na concentração de 77mg/mL observou-se ação tóxica, bem como ação antitoxicológica ($P<0,05$), demonstrando que houve uma interação benéfica com o CP.

Os resultados da toxicidade e antitoxicidade dos diferentes tratamentos sobre o ciclo celular de *A. cepa* podem ser observados na Figura 4 e Tabela 2.

Os resultados mostraram que o tratamento de 3,85mg/mL aumentou a divisão celular de maneira significativa ($P<0,001$), diferentemente das concentrações de 77mg/mL ($P<0,05$) e 192mg/mL ($P<0,001$), que demonstraram ação antiproliferativa do índice mitótico. Esses dados corroboram com os resultados de efeitos tóxicos ocasionados pela concentração de 77mg/mL (Tabela 1; Figura 3 a).

Os tratamentos de 3,85mg/mL ($P<0,001$), 38,5 mg/mL ($P<0,001$) e 77mg/mL ($P<0,05$) apresentaram ação inibitória dos efeitos ocasionados pelo CP, estando de acordo também com os testes antitoxicológicos descritos anteriormente.

O único tratamento que apresentou ação mutagênica foi o de 192mg/mL ($P<0,001$) (Figura 5 a), sendo observada nesta concentração algumas pontes anafásicas (Figura 4 i), que são alterações ocorrentes devido a mutagenicidade (STURBELLE et al., 2008).

Nos testes de antimutagenicidade os resultados coincidiram com os de antitoxicidade, tendo ação significante as concentrações de 3,85 e 38,5mg/mL ($P<0,001$) (Figura 5 b).

O extrato aquoso da entrecasca *M. guyanensis* nas concentrações de 3,85 e 38,5 mg/mL não apresenta ação citotóxica e mutagênica, e ainda atuam como anticitotóxico e antimutagênico, porém mesmo nessas concentrações é indicado estudos de biacumulação, para um melhor entendimento dos efeitos da utilização desses extratos vegetais a longo prazo (SILVA; FERREIRA, 2003).

O tratamento de 77mg/mL demonstrou ter ação citotóxica e anticitotóxica na presença de paracetamol, porém não demonstrou ação mutagênica e antimutagênica. A concentração de 192mg/mL demonstrou ser citotóxica e mutagênica. Mesmo com potencial citotóxico e mutagênico dessas concentrações, é improvável a ocorrência de ação negativa no corpo humano, visto que a dose utilizada pelas populações tradicionais é 50 vezes inferior a concentração de 192mg/mL.

Os resultados acima descritos estão de acordo com estudo realizado por Hurtado (2013), onde nos testes de atividade genotóxica o extrato acetônico da entrecasca e os eluatos de *M. guyanensis* demonstraram atividade antiproliferativa com tempo de exposição prolongado, não apresentando ação clastogênica e aneugênica. Resultado semelhante também foi observado na espécie *M. senegalensis*, que não apresentou atividade mutagênica (REID et al., 2006).

Em outro estudo a análises de células meristemáticas de *A. cepa* demonstrou que concentrações mais elevadas de extrato de *M. ilicifolia* promoveram redução no índice mitótico e nenhum surgimento de alterações cromossômicas (CAMPARATO et al., 2002). Entretanto, Souza et al. (2005) demonstraram que na concentração de 40 mg/mL, houveram alterações cromossômicas (pontes anafásicas) que também foi observado no tratamento de 192mg/mL do presente estudo, sugerindo um potencial genotóxico e efeito alelopático que podem ser explicado pela presença de saponinas, taninos e flavonas ocorren-

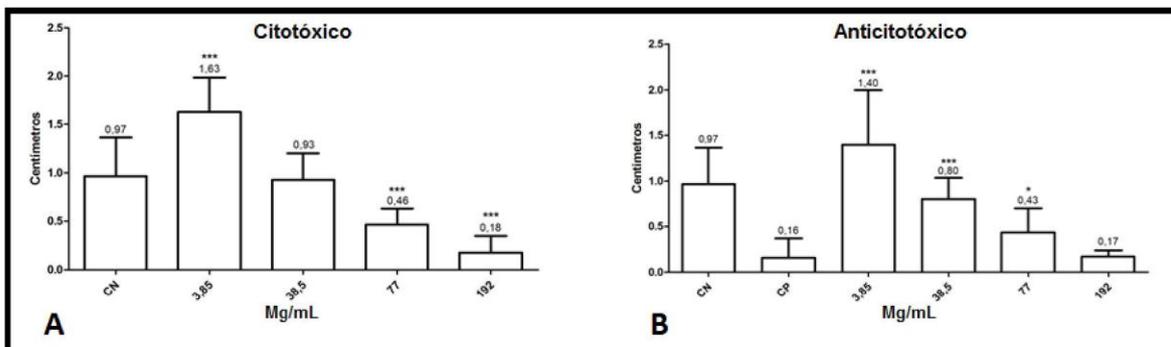


Figura 3. A e B) Média do tamanho da germinação dos meristemas de *A. cepa*, para análise citotóxica e anticitotóxica. *($P<0,05$), ** ($P<0,01$) e *** ($P<0,001$). CN: Controle negativo. CP: Controle positivo.

Tabela 1. Germinação em das raízes de *A. cepa* (toxicidade e antitoxicidade) e número de micronúcleos por 1000 células (mutagenicidade e antimutagenicidade). (Concentrações em mg/mL).

Espécimes (<i>A. cepa</i>)	Toxicidade					Antitoxicidade					
	CN	3,85	38,5	77	192	CN	CP	3,85	38,5	77	192
1	1,5	1,8	0,5	0,4	0,2	1,5	1,1	2,4	1,1	0,3	0,2
	1,6	1,9	0,8	0,5	0,1	1,6	0,4	2,2	0,9	0,2	0,2
	1,5	1,1	0,8	0,4	0,1	1,5	0,1	2	0,9	0,2	0,1
2	1,5	1,1	0,8	0,8	0,2	1,5	0	0,5	0,6	0,3	0,2
	1,3	1,4	0,9	0,4	0,2	1,3	0	0,4	0,9	0,3	0,1
	0,9	1	1,4	0,3	1	0,9	0	0,4	0,8	0,3	0,1
3	1,3	2	0,8	0,8	0,2	1,3	0,1	1,6	0,6	0,4	0,3
	1,2	2	1,5	0,6	0,1	1,2	0,1	1,4	0,6	0,1	0,3
	1,4	2,1	1,5	0,7	0,1	1,4	0,1	1,3	0,5	0,1	0,3
4	0,5	1,9	0,8	0,5	0,2	0,5	0,1	2	0,4	0,4	0,2
	0,8	1,6	0,9	0,6	0,2	0,8	0,3	1,9	0,4	0,3	0,1
	1	1,9	0,8	0,6	0,2	1	0,4	1,8	0,4	0,1	0,1
5	0,6	1,9	1,1	0,6	0,1	0,6	0,2	0,7	1,2	0,4	0,2
	0,5	1,7	1	0,5	0,1	0,5	0,4	1	1,1	0,6	0,2
	0,5	1,9	1	0,5	0,1	0,5	0,2	0,6	1,1	0,3	0,2
6	0,8	1,5	0,9	0,3	0	0,8	0	1,2	0,6	0,8	0,1
	0,9	1,2	0,9	0,3	0,1	0,9	0	1,1	0,6	1	0,1
	0,8	1,2	0,8	0,2	0,1	0,8	0	0,9	0,5	0,7	0,2
7	0,6	1,4	0,9	0,4	0,2	0,6	0,2	0,8	1	0,5	0,2
	0,9	1,5	0,8	0,4	0,2	0,9	0,1	0,8	0,9	0,3	0,2
	0,9	1,2	1	0,3	0,2	0,9	0,2	0,9	0,8	0,2	0,3
8	1,4	1,1	1,2	0,2	0,1	1,4	0,1	2	1	0,9	0,1
	0,4	1,8	1,2	0,2	0,1	0,4	0	1,3	1,1	0,8	0,1
	0,2	1,9	1,5	0,3	0	0,2	0	1,1	0,8	0,9	0,2
9	1,5	1,9	0,6	0,6	0,3	1,5	0,1	1,9	0,9	0,7	0,2
	1,4	2,3	0,7	0,6	0,2	1,4	0,1	1,8	1	0,6	0,2
	0,8	1,8	0,8	0,6	0,3	0,8	0,1	2,1	0,9	0,6	0,1
10	0,5	1,5	0,8	0,4	0,1	0,5	0,1	1,9	0,8	0,2	0,1
	0,8	1,4	0,6	0,5	0,2	0,8	0,1	2	0,9	0,2	0,1
	1	1,9	0,6	0,4	0,1	1	0,1	1,9	0,8	0,3	0,1
Média	0,97	1,63	0,93	0,46	0,18	0,97	0,16	1,4	0,8	0,43	0,17

Espécimes (<i>A. cepa</i>)	Mutagenicidade					Antimutagenicidade					
	CN	3,85	38,5	77	192	CN	CP	3,85	38,5	77	192
1	3	0	0	0	7	3	6	4	3	12	8
	0	0	0	0	8	0	10	3	4	9	8
2	0	0	0	3	9	0	8	1	6	3	6
	0	0	0	4	9	0	8	0	2	2	8
3	0	0	0	0	8	0	7	2	8	8	9
	0	0	5	0	7	0	9	2	8	7	8
4	0	2	0	0	6	0	5	1	6	6	11
	0	0	0	4	5	0	6	0	4	5	9
5	3	5	5	3	5	3	4	0	6	9	6
	4	5	0	1	4	4	9	2	2	9	6
6	3	7	0	4	5	3	8	1	3	3	7
	2	4	0	0	4	2	5	3	4	5	5
7	2	0	0	0	6	2	5	0	3	4	6
	3	0	0	0	8	3	9	1	4	8	4
8	0	0	0	0	8	0	10	1	5	6	8
	1	0	0	0	4	1	4	2	4	6	6
9	0	0	0	0	8	0	7	1	3	8	4
	0	3	0	4	5	0	6	3	5	7	8
10	2	5	0	2	5	2	4	1	4	6	9
	1	0	0	0	8	1	11	0	4	6	8
Média	1,2	1,55	0,5	1,25	6,45	1,2	7,05	1,4	4,4	6,45	7,2

CN: Controle negativo. CP: Controle positivo.

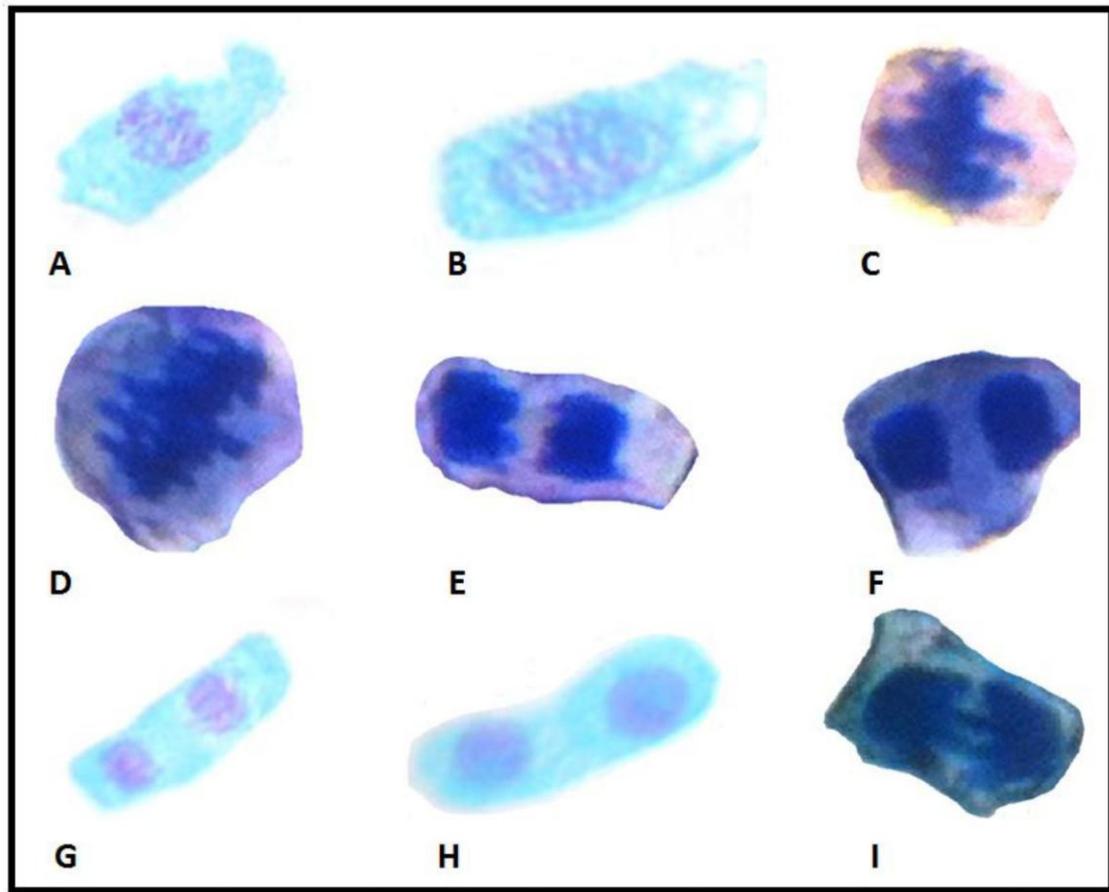


Figura 4. Células de *A. cepa* em mitose, aumento de 400X. A e B) células em prófase; C e D) células em metáfase; E, F e G) células em anáfase; H) células em telófase; I) ocorrência de ponte anafásica.

Tabela 2. Tratamento, número total de células de *A. cepa* analisadas no ciclo celular em interfase, prófase, metáfase, anáfase e telófase.

Tratamento	Número de Células			Índice Mitótico (%)
	Total	Interfase	Mitose	
CN	20.000	16.720	3.280	16,40
3,85mg/mL	20.000	10.177	9.823	49,11 ***
38,5mg/mL	20.000	17.002	2.998	14,99
77mg/mL	20.000	18.174	1.826	9,13 *
192mg/mL	20.000	18.886	1.114	5,57 ***
CP	20.000	19.011	989	4,94
CP + 3,85mg/mL	20.000	11.099	8.901	44,50 ***
CP + 38,5mg/mL	20.000	17.933	2.067	10,33 ***
CP + 77mg/mL	20.000	18.355	1.645	8,22 *
CP + 192mg/mL	20.000	18.906	1.094	5,47

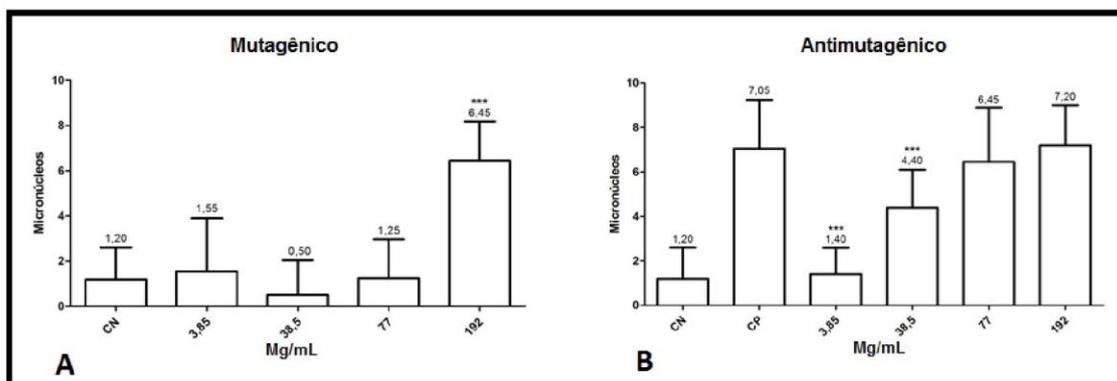


Figura 5. A e B) Média do número de micronúcleos encontrados em 1000 células de *A. cepa*, germinadas em extrato aquoso de *M. guyanensis*, para análise mutagênica e antimutagênica. *($P < 0,05$), ** ($P < 0,01$) e *** ($P < 0,001$). CN: Controle negativo. CP: Controle positivo.

tes na espécie *M. ilicifolia* (MARIOT; BARBIERI, 2007).

A espécie *M. guyanensis* produz duas classes de triterpenos na sua entrecasca os friedelanos e os quinonametídeos (HURTADO, 2013), porém poucos são os estudos que enfatizam os efeitos tóxicos e mutagênicos dos triterpenos de maneira isolada.

Composto triterpenoídico maitensina atua in vitro contra células tumorais e em tumores experimentais, onde o extrato de *M. ilicifolia* apresentou atividade inibitória sobre diferentes sarcomas e células neoplásicas (SANTOS-OLIVEIRA; COULAUD-CUNHA; COLAÇO, 2009), reforçando os resultados antimutagênicos das concentrações 3,85 e 38,5mg/mL do extrato aquoso de *M. guyanensis*, que ocorreu provavelmente devido a presença de friedelanos que também apresentam atividade citotóxica sobre linhagens tumorais in vitro (SHIROTA et al., 1994; ZENG, 1994).

Em outro estudo a espécie *M. guyanensis* também não provocou hemólise em eritrócitos humanos, não apresentou efeito coagulante ou anticoagulante até a concentração de 1 mg/mL e ainda demonstrou potencial antiagregante possibilitando a utilização dessa espécie para fins farmacológicos (MAIA; LIMA; VASCONCELLOS, 2009).

É importante lembrar que apesar da literatura destacar os triterpenos como principais compostos bioativos da família Celastraceae, a mesma também é rica em sesquiterpenos, que podem ser os principais responsáveis por causarem pequenos danos no DNA quando essas plantas são administradas em concentrações elevadas (CORSINO et al., 1998), como observado no presente estudo com 192mg/mL.

4 Conclusão

O presente estudo demonstrou em células de *A. cepa* incolumidade em relação aos efeitos citotóxicos e

mutagênicos em concentrações até 10 vezes maior que a utilizada no uso tradicional de *M. guyanensis*. São indicados estudos futuros in vitro (linfócitos) e in vivo (camundongos) para uma melhor compreensão dos efeitos fisiológicos dos extratos e compostos isolados, para melhores conclusões sobre o uso seguro da mesma, e até mesmo o desenvolvimento de um fitoterápico ou fármaco tendo esta espécie como matéria prima.

Referências

- BAGATINI, M. D.; SILVA, A. C. F.; TEDESCO, S. B. Uso do sistema de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. *Rev. Bras. Farmacogn.*, v. 17, n.3, p. 444-447, 2007.
- BESSEMS, J. G.; GAISSER, H. D.; TE KOPPELE, J. M.; VAN BENNEKOM, W. P.; COMMANDEUR, J. N.; VERMEULEN, N. P. 3,5-Disubstituted analogues of paracetamol. Synthesis, analgesic activity and cytotoxicity. *Chem. Biol. Interact.*, v. 98, n. 3, p. 237-250, 1995.
- BORRÁS, M.R.L. Plantas da Amazônia: medicinais ou mágicas - Plantas comercializadas no Mercado Municipal Adolpho Lisboa. Editora Valer/Governo do Estado do Amazonas, Manaus, 2003, 322p.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 116/MS/SNVS/96, de 8 de agosto de 1996, Norma para Estudo da Toxicidade e da Eficácia de Produtos Fitoterápicos. Brasília: ANVISA, 1996.
- CAMPAROTO, M. L.; TEIXEIRA, R. O.; MANTOVANI, M. S.; VICENTINI, V. E. P. Effects

- of *Maytenus ilicifolia* Mart. and *Bauhinia candicans* Benth infusions on onion root-tip and rat bone-marrow cells. *Genet. Mol. Biol.*, v. 25, n. 1, p. 85-89, 2002.
- CANTERLE, L.P. Erva-mate e atividade antioxidante. (Dissertação) Mestrado - Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2005.
- CORSINO, J.; BOLZANI, V. S.; PEREIRA, A. M. S.; FRANÇA, S. C.; FURLAN, M. Further sesquiterpene pyridine alkaloids from *Maytenus aquifolium*. *Phytochem.*, v. 48, p. 137-140, 1998.
- DÜSMAN, E.; BERTI, A. P.; SOARES, L. C.; VICENTINI, V. E. P. Principais Agentes Mutagênicos e Carcinogênicos de Exposição Humana. *Rev. Saúde e Biol.*, v. 7, n. 2, p. 66-81, 2012.
- DUTRA, M.G. Plantas medicinais, fitoterápicos e saúde pública: um diagnóstico situacional em Anápolis, Goiás. (Dissertação) Mestrado em Sociedade, Tecnologia e Meio Ambiente - Centro Universitário de Anápolis. Anápolis, Goiás, 2009, 112p.
- FÃO, F.; ZAN, R. A.; BRONDANI, F. M. M.; RAMOS, L. J.; MENEGUETTI, D. U. O. Análise do potencial mutagênico da seiva da casca de *Croton lechleri* (Müll. Arg), no Estado de Rondônia, Amazônia Ocidental. *Rev. Saúde e Biol.*, v. 7, n. 1, p. 91-98, 2012.
- FDA. Food And Drug Administration. Guidance for Industry Safety Testing of Drug Metabolites, 2008, 14p.
- FISKESJÖ, G. The Allium test as a standard in environmental monitoring. *Hered.*, v. 102, n.1, p. 99 - 112, 1985.
- FISKESJÖ, G. The Allium Test II: Assesment of chemical's genotoxic potential by recording aberrations in chromosomes and cell divisions in root tips of *Allium cepa* L. *Environ. Toxicol. Wat. Qual.*, v. 9, n. 3, p. 234-241, 1994.
- FONSECA, A. P. N. D.; SILVA, G. D. F.; CARVALHO, J. J. C.; SALAZAR, G. D. C. M.; DUARTE, L. P.; SILVA, R. P.; TAGLIATI, C. A.; ZANI, C. L.; NEVES, T. M. A.; PERES, V.; VIEIRA-FILHO, S. A. Estudo fitoquímico do decocto das folhas de *Maytenus truncata* Reissek e avaliação das atividades antinociceptiva, antiedematogênica e antiulcerogênica de extratos do decocto. *Quím. Nova*, v. 30, n. 4, p. 842-847, 2007.
- GIULIETTI, A. M.; HARLEY, R. M.; QUEIROZ, L. P.; WANDERLEY, M. G. L.; BERG, C. V. D. Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil. *Rev. Megadiver*, v. 1, n. 1, p. 54-61, 2005.
- HURTADO, F. B. Contribuição ao estudo fitoquímico e biológico da entrecasca da espécie *Maytenus guyanensis* klotzsh ex Reissek. (Tese) Doutorado em Biologia Experimental – Fundação Universidade Federal de Rondônia (UNIR), Porto Velho, Rondônia, 2013.
- LANG, G.; MAYHUNDIN, N.A.; MITOVA, M.I.; SUN, L.; VAN DER SAR, S.; BLUNT, J.W.; COLE, A.L.J.; ELLIS, G.; LAATSCH, H. & MUNRO, M.H.G. Evolving trends in the dereplication of natural products extracts: New methodology for rapid, small-scale investigation of natural products. *J. Nat. Prod.*, v. 71, n. 9, p. 1595-1599, 2008.
- LIÃO, L. M. Triterpenos quinonametideos de *Salacia campestris* (Hippocrateaceae). (Dissertação) Mestrado em Química, Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, 1994.
- LIÃO, L.M. Alcaloides Sesquiterpênicos Piridínicos e Triterpenos Quinonametídeos Degradados de *Salacia campestris* (Hippocrateaceae). (Tese) Doutorado em Ciências (Química Orgânica) - Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, 1997.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e exóticas. Ed. 2ª . Nova Odessa: Plantarum, 2008, 608p.
- MAIA, B.L.; LIMA, E. S.; VASCONCELLOS, M. C. Avaliação da Atividade Hemolítica, Coagulante e Antiagregante Plaquetária do Extrato Seco da Casca de *Maytenus guyanensis*. 61ª Reunião Anual da SBPC, 2009.
- MARIOT, M.P.; BARBIERI, R.L. Metabólitos secundários e propriedades medicinais da espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. e *Maytenus aquifolium* Mart.). *Rev. Bras. Pl. Med.*, v.9, n.3, p.89-9, 2007.
- MENEGUETTI, D. U. O.; SILVA, F.C.; ZAN, R.A.; RAMOS, L.J. Adaptation of the micronucleus technique in *Allium cepa*, for mutagenicity analysis of the Jamari river valley, western Amazon, Brazil. *J Environ. Anal. Tox.*, v. 2, n.2, 2012.
- OLIVEIRA, J.M.; YAMASHITA, M.; MENEGUETTI, D. U. O. Análise do Potencial Mutagênico em Afluentes do Rio Boa Vista Influenciados Pela

- Emissão de Rejeitos de Uma Indústria de Laticínios no Município de Ouro Preto do Oeste RO, Brasil. In: VIII Jornada Científica Centro de Estudos Interdisciplinar em Desenvolvimento Sustentável da Amazônia. E-book VIII Jornada Científica do CEDSA, v. 8. p. 73-88, 2013.
- POLETO, P. O.; DINIZ, A. P.; BERNARDON, B.; ZAN, R. A.; RAMOS, L. J.; MENEGUETTI, D. U. O. Análise da mutagenicidade do extrato hidrossolúvel de *Derris rariflora* (Mart. Ex Benth. J. F. Macbr: Fabaceae), timbó amazônico, através do teste micronúcleo em *Allium cepa*. Rev. Pesq & Criação, v. 10, n. 1, p.163-175, 2011.
- REID, K. A.; MAES, J.; VAN STADEN, J.; DE KIMPE, N.; MULHOLLAND, D. A.; VESCHAEVE, L. Evaluation of the mutagenic and antimutagenic effects of South African plants. Jour. of Ethnopharmacology, v. 106, n.1, p. 44-50, 2006.
- REVILLA, J. Apontamentos para a cosmética amazônica. SEBRAE-AM/INPA, Manaus, 2002, 532pp.
- RODRIGUES, S. B. V.; MIRANDA, R. R. S.; DUARTE, L. P.; SILVA, G. D. F.; OLIVEIRA, D. M.; LULA, I. S. Triterpenos pentacíclicos isolados de *Salacia elliptica* (Mart.) Peyr. 29^o Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (SBQ). Belo Horizonte, Minas Gerais, 2006.
- SANTOS-OLIVEIRA, R.; COULAUD-CUNHA, S.; COLAÇO, W. Revisão da *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek, Celastraceae. Contribuição ao estudo das propriedades farmacológicas. Rev. Bras. Farmacogn, v. 19, n. 2B, p. 650-659, 2009.
- SHIROTA, O.; MORITA, H.; TAKEYA, K.; ITOKAWA, H. Cytotoxic aromatic triterpenes from *Maytenus ilicifolia* and *Maytenus chuchuhuasca*. Phytochem, v. 57, n. 12, 1675 – 1681, 1994.
- SILVA, A. M. ; SOUZA, A. M. ; MACIEL, F. P. ; DINIZ, A. P. ; ZAN, R. A. ; RAMOS, L. J. ; BARBOSA, N. V. ; MENEGUETTI, D. U. O. . Analysis Physical-chemical, Mutagenic and Antimutagenic de *Morinda Citrifolia* L. (Rubiaceae: Rubioideae) Noni, Germinated in the Region of Brazilian West Amazon. O. A. Scien. Rep, v. 1, p. 569, 2012.
- SILVA, J. A.; COSTA, R. S.; MARIANO, A. S.; SANTOS, K. L. S.; SILVA, C. O. J. Análise farmacognóstica de amostras de espinheira santa - *Maytenus ilicifolia* (Schrad.) Planch. (Celastraceae) comercializadas em farmácias e banca popular de Votuporanga – São Paulo. Rev. Bras. Farmacogn, v.93, n.4, p.457-462, 2012.
- SILVA, L. R.; FERREIRA, M. M. C. Estudo do coeficiente de partição octanol-água de bifenilas policloradas (PCBs) utilizando parâmetros topológicos. Quím. Nova, v. 26, n. 3, p. 312-318, 2003.
- SOUZA, S. A. M.; STEIN, V. C.; CATTELAN, L. V.; BOBROWSKI, V. L.; ROCHA, B.H.G. Utilização de sementes de alface e de rúcula como ensaios biológicos para avaliação do efeito citotóxico e alelopático de extratos aquosos de plantas medicinais. Rev. Biol. Ciên. Terra. Belo Horizonte. v. 5, n. 1, p. 3-9, 2005.
- STURBELLE, R.; PINHO, D. S.; RESTANI, R. G.; OLIVEIRA, G. R.; GARCIAS, G.L.; MARTINOROTH, M.G. Avaliação da atividade mutagênica e antimutagênica da *Aloe vera* em teste de *Allium cepa* e teste de micronúcleo em linfócitos humanos binucleados. Rev. Bras. Farmacogn, v. 20, n.3, p. 409-415, 2010.
- TEIXEIRA, R.O.; CAMPAROTO, M.L.; MANTOVANI, M.S.; VICENTINI, V.E.P. Assessment of two medicinal plants, *Psidium guajava* L. and *Achillea millefolium* L. in in vivo assays. Genet. Mol. Biol, v. 26, n.4, p. 551-555, 2003.
- ZENG, C.Q. Cytotoxic triterpenoids and flavonoids from. Plant. Med, v. 60, n.1, p. 54-57, 1994.

ANEXOS III

Artigo Publicado na Revista Brasileira de Farmacognosia



Original Article

 Acute genotoxicity analysis *in vivo* of the aqueous extract of *Maytenus guyanensis* Amazonian chichuá

 Dionatas Ulises de Oliveira Meneguetti^{a,b,c,*}, Renato Abreu Lima^{c,d}, Francisco Carlos da Silva^{e,f},
Guilherme Matos Passarini^g, João Bezerra Facundo^g, Rubiani de Cassia Pagotto^g,
Júlio Sancho Linhares Teixeira Militão^{c,h}, Valdir Alves Facundo^{a,c,d,h}
^a Programa de Pós-graduação em Biologia Experimental, Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, RO, Brazil

^b Colégio de Aplicação, Universidade Federal do Acre, Rio Branco, AC, Brazil

^c Laboratório de Química de Produtos Naturais, Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, RO, Brazil

^d Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal (Rede Bionorte), Manaus, AM, Brazil

^e Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde, Universidade Luterana do Brasil, Canoas, RS, Brazil

^f Centro Universitário Luterano de Ji-Paraná, Ji-Paraná, RO, Brazil

^g Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, RO, Brazil

^h Departamento de Química, Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, RO, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 January 2015

Accepted 9 March 2015

Available online 30 March 2015

Keywords:

Mutagenicity

Maytenus guyanensis

Western Amazon

ABSTRACT

The species *Maytenus guyanensis* Klotzsch ex Reissek, Celastraceae, present a wide variety of possible pharmacological activities and its roots and stems are used by popular medicine in the western Amazon rainforest. Few studies have demonstrated the genotoxic safety of the popular use of this species, and owing to this, the present study aimed to perform an analysis of the acute genotoxicity *in vivo* of the aqueous extract of *M. guyanensis*. Male and female mice from *Mus musculus* species, of weights ranging from 20 to 40 g, organized in eight groups with different treatments were used. The aqueous extracts of the bark of *M. guyanensis* were administered orally by gavage with 0.1 ml of the test substance per 10 g of the animal, followed by performance of comet assay in peripheral blood, PCE/NCE correlation and occurrence of micronuclei in the bone marrow. It was found that the aqueous extract of *M. guyanensis*, with ten times higher concentration than those used in ethnopharmacology, did not present genotoxic effect and, moreover, it has antigenotoxic action in mice treated acutely. Further studies regarding bioaccumulation and chronic effects of this species are suggested, in order to improve the understanding of its mechanism of action, ensuring the efficacy and safety of its utilization and developing phytotherapies and drugs.

© 2015 Sociedade Brasileira de Farmacognosia. Published by Elsevier Editora Ltda. All rights reserved.

Introduction

Brazil possesses almost 19% of the world's flora, of which the Amazon Forest is one of the most rich and diversified area on the planet; however, roughly 99% of the medicinal plants do not have its efficacy and pharmacological safety proven (Giulietti et al., 2005; Fão et al., 2012; Meneguetti et al., 2014), making necessary a phytochemical and pharmacological approach (Andrade et al., 2007), which may represent a great economic potential to be explored by the pharmaceutical industry (Cechinel-Filho and Rosendo, 1998).

The popular medicinal species *Maytenus guyanensis* Klotzsch ex Reissek belongs to Celastraceae botanical family and is a small endemic tree, popularly known as “chichuá”, “xixuá”, “chuchauasi”, “chuchuhuashu”, “chuchuasi”, “chuchasa” or “tonipulmon” (Revilla, 2001; Prata, 2007; Prata and Mendonca, 2009). The species present a wide variety of possible pharmacological activities, wherein its roots and stems are used popularly as analgesic, muscle relaxant, wound healing, insecticide, immunosuppressive, anti-inflammatory, anti-ulcerogenic, anti-rheumatism, anti-diarrheal, antibacterial, antifungal, anti-helminthic, antiprotozoal, antitumor, aphrodisiac and gynecologically active (Revilla, 2002; Borrás, 2003; Macari et al., 2006; Fonseca et al., 2007).

Phytochemical studies of species from the genus *Maytenus* have demonstrated presence of several chemical groups, in which we can contrast the quinone-methide triterpenoids that presented several biological activities, such as tripanocide (Duarte et al.,

* Corresponding author.

E-mail: dionatas@icbusp.org (D.U.d.O. Meneguetti).

2002), anti-helminthic (Mena-Rejón et al., 2007), cytotoxic and antitumor (Morita et al., 2008). Other metabolites identified within this genus were: tannins, flavonoids and alkaloids (Santos-Oliveira et al., 2009; Gonzalez et al., 1996; Chavez et al., 1998).

Phytochemical studies of leaves, stem barks and roots of *M. guyanensis* lead to isolation and identification of ten terpenoids, wherein five are friedelane: friedelene, friedelol, 16 β -friedelene, 29-hydroxyfriedelene and 3,7-friedelodione; one of them is a β -amerine oleanane; one of them is a α -amerine ursane, and three are friedo-nor-oleanane (quinine-methides): tingenone, 22-hydroxytingenone and 22-hidroxi-pristimerine. In addition, two steroids: β -sitosterol and sitostenone, one sesquiterpene alkaloid named *N,N*-dimethylserine (Sousa et al., 1986; Facundo et al., 2015) and one flavonoid: 4-methyl-epigallocatechine (Macari et al., 2004) were also identified; however, few studies have demonstrated the genotoxic safety of the popular use of this species, and owing to it, the present study aimed to perform an analysis of the acute genotoxicity *in vivo* of the aqueous extract of *M. guyanensis*.

Materials and methods

Collection and identification of botanical material

The barks of *Maytenus guyanensis* Klotzsch ex Reissek, Celastraceae, were collected in February 2008 at the Adolpho Ducke's Forest Reserve, located at the km 26, AM-010 road (Manaus-Itacoatiara – Lat 02°53' S, Long 59°58' W). The identification of the species was done at the Herbário do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA), Exsiccate n° 188.485.

Extract preparation

Barks from *M. guyanensis* were grinded to improve solvent contact area. The extract was prepared by infusion with distilled water for 10 min at 80 °C, at the following concentrations: 3.85 mg/ml, value normally used by populations and ten, twenty and fifty times more concentrated (Camparoto et al., 2002; Meneguetti et al., 2014).

Animals' treatment

The tests were performed from January to March 2014, at Laboratory de Genetic e Toxicology Applied from Centro academic Lutheran de Ji-Paraná (CEULJI/ULBRA), in Ji-Paraná city, Rondônia, Brazil. All of the experiments were approved by Ethics Committee on Animal Use (CEUA) from Oswaldo Cruz Foundation – RO (Fiocruz-RO), protocol number 2013/12.

Mus musculus's male and female mice were used, acquired from CEULJI/ULBRA vivarium, with weight ranging from 20 to 40 g. The aqueous extracts from barks of *M. guyanensis* were administered *via* oral gavage, two amounts at 48 and 24 h, respectively, before the test began. The animals were weighed before the dosage and the volume administered was calculated as 0.1 ml of the testing substance *per* 10 g of the animal.

The animals were divided into eight groups, each one containing eight animals, four were male and four female, and they were maintained in environments with controlled temperature (25 °C), with cycles of 12 h of light and 12 h of darkness, in polyethylene cages, with access to water and food.

The following groups were organized as follows:

G1 – negative control (CN), where only H₂O was administered; G2 to G5 – treated with aqueous extracts of *M. guyanensis* in concentrations 3.85 mg/ml, 38.5 mg/ml, 77 mg/ml and 192 mg/ml, respectively;

G6 and G7 – treated, respectively, with 3.85 mg/ml and 38.5 mg/ml, with addition of 2.0 mg cyclophosphamide *per* 100 g of animal weight, treated *via* intraperitoneal injection, 24 h before the application of the first dose of the aqueous extract of *M. guyanensis*. These concentrations were chosen, based on a study carried out by Meneguetti et al. (2014), in which these same concentrations presented anticytotoxic and anti-mutagenic action in *in vitro* studies;

G8 – positive control (CP), just 2.0 mg of cyclophosphamide was administered *per* 100 g of mice weight (Magalhães et al., 2010), *via* intraperitoneal injection, 24 h before the application of the first dose of the aqueous extract of *M. guyanensis*, being also treated with 0.1 ml of H₂O *per* 10 g of the animal, *via* gavage, at the same periods as too much groups.

Comet assay

The genotoxicity and acute antigenotoxicity analysis were done by comet assay, from the method described by Singh et al. (1988) and reviewed by Tice et al. (2000). The experiment was performed in blood cells from the animals submitted to the treatment with the aqueous extract of *M. guyanensis*. The peripheral blood of animals was collected after the decapitation with a guillotine, wherein two slides *per* animal were prepared.

The samples in cellular suspension were mixed with a thin layer of agar “low melting” 0.75% and laid upon layers pre-covered with normal agarose at 1.5%. These slides were plunged in a lysis solution (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA and 10 mM Tris, pH 10 with addition of 1% Triton X-100 and 10% DMSO at the time of use), for 96 h at 4 °C. The lysis enables the migration of the DNA fragments that were brought about after incubation of the slides in alkaline tampon (300 mM NaOH and 1 mM EDTA, pH > 13) for 20 min and, subsequently, an electric current of 300 mA and 25 V (0.90 V/cm) was applied for 15 min in a DNA electrophoresis vat. The slides were neutralized after electrophoresis with three tampons at 0.4 M, pH 7.5 and colored with silver nitrate.

The analysis of the cells was performed randomly by visual evaluation, totaling 100 cells/slide, wherein two parameters were considered: Damage Index (0–400) and Damage Frequency (0–100%).

Correlation PCE/NCE and occurrence of micronuclei in bone marrow

Phosphate tampon

The solutions A and B were prepared separately. For the solution A, 27.6 g of anhydride potassium phosphate (KH₂PO₄) was added *per* liter of distilled water. In the solution B was added 35.6 g of sodium dibasic phosphate (Na₂PO₄·7H₂O) *per* liter of distilled water. After, 16.5 ml of the solution A was added to 46 ml of the solution B and 37.5 ml of distilled water was added, filling with 100 ml with the phosphate tampon with pH = 5.8 (Silva et al., 2011).

Bone medulla gathering and preparation of the microscopic slides

After the animals were sacrificed by guillotine decapitation, the femurs were withdrawn, cleaned and the two ends removed with a surgical scissor. The bone marrow was extracted with a histological needle directly upon the slide with 10 μ l of fetal bovine serum, and with a curved histological needle the marrow was homogenized with serum, wherein a smear of each femur was made, and two slides *per* animal were prepared.

The slides were dried in an incubator at 37 °C, colored with a mixture of Giemsa (10%) and phosphate tampon (pH = 5.8), washed with distilled water, dried at room temperature and marked with a numeric code, for a “blind” analysis. The coloration was used to

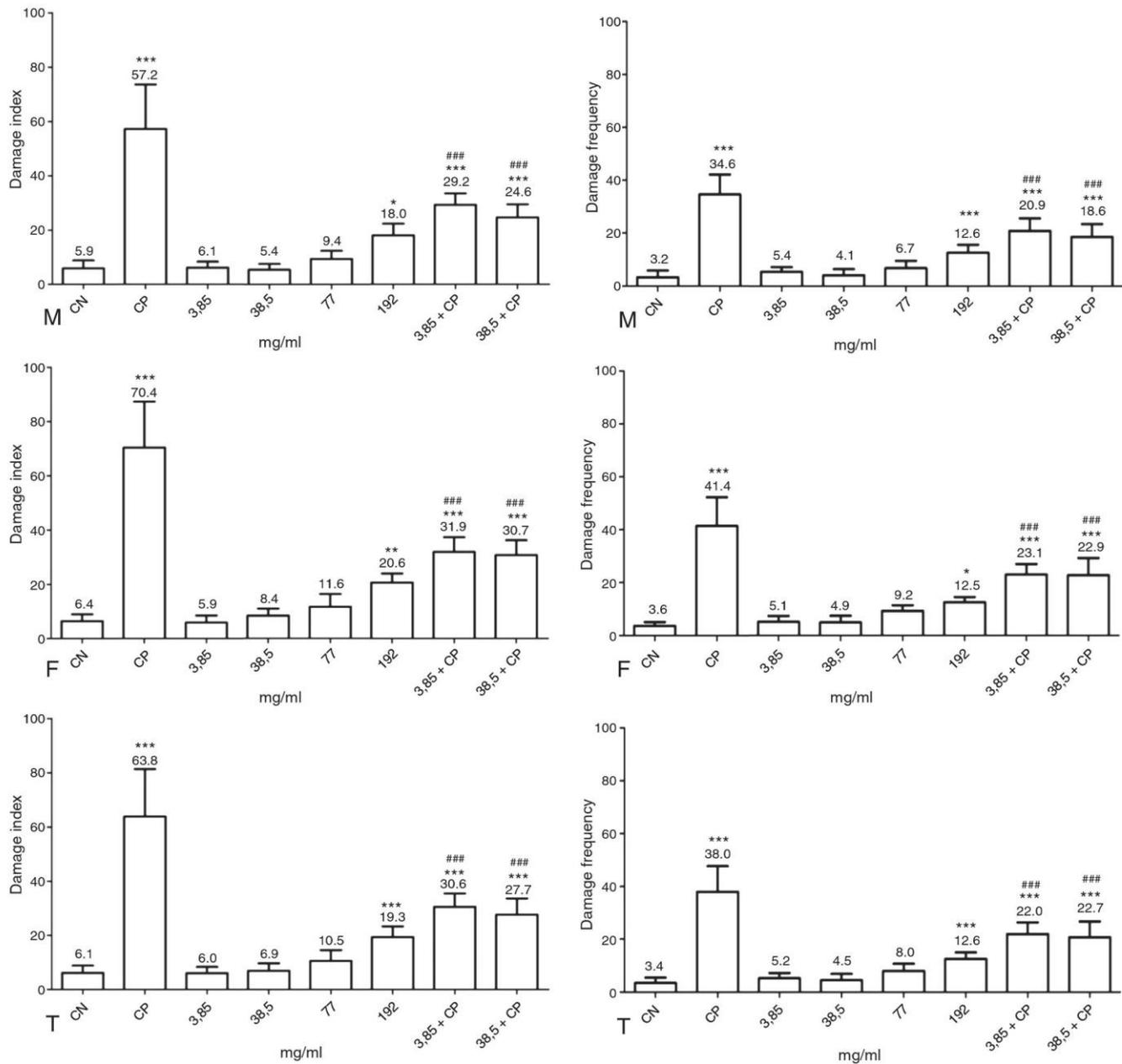


Fig. 1. Genotoxic and antigenotoxic acute effects evaluated in damage index and damage frequency by the comet test in peripheral blood of mice, which underwent the treatment with aqueous extract of *M. guyanensis*. M: Males; F: Females; T: Total – Male and Female. Statistically significant for genotoxicity * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$) and *** ($p < 0.001$) when compared to CN. Statistically significant for antigenotoxicity # ($p < 0.05$), ## ($p < 0.01$) and ### ($p < 0.001$) when compared to CP.

differentiate light blue polychromatic erythrocytes (PCE) and red normochromatic erythrocytes (NCE) (Ribeiro et al., 2003).

Analyses of slides

The zig-zag model was used to determine simultaneously the amount of micronuclei of each 1000 PCE and the relationship between PCE and NCE in 1000 erythroid cells per slide.

This relationship was established to avoid determination of false-negatives, demonstrating whether there was cytotoxicity or cellular depression (Shahrim et al., 2006). Afterwards, the count of only micronuclei in PCE was continued until the count of 1000 cells. The count of micronuclei occurred only in PCE, due to its indication for organisms with acute exposition analysis (Villela et al., 2003), the same as used in the present study.

Statistical analysis

The variance analysis was done by the ANOVA test, using Turkey's test as a counterproof, affecting the comparison of the means of different treatments with the control groups. For this purpose, the software Graph pad Prism 5.0 was used.

Results

Comet assay

The acute genotoxicity results demonstrated by the index and frequency of damage performed by the comet assay can be observed in Fig. 1. The 3.85 mg/ml, 38.5 mg/ml and 77 mg/ml concentrations did not present genotoxic effects, unlike the 192 mg/ml, that presented significant genotoxicity relative to CN.

In the analysis of the antigenotoxic potential, 3.85 mg/ml and 38.5 mg/ml concentrations demonstrated significant decrease in both the damage index and the damage frequency relative to the CP group.

Correlation PCE/NCE

The data corresponding to the correlation PCE/NCE influenced by the aqueous extract of *M. guyanensis* are organized in Table 1. The correlation PCE/NCE of the 3.85 mg/ml and 18.5 mg/ml concentrations did not present significant difference relative to CN. This result was not observed in the 77 mg/ml and 192 mg/ml concentrations, that decreased the correlation, demonstrating the occurrence of cytotoxicity (Shahrim et al., 2006; Silva et al., 2011), that is normally confirmed due to the dose-response effect (Krishna and Hyashi, 2000) and the likely explanation is that the frequency of cell depression (Nesslany et al., 2004) can induce to apoptosis (Ouanes et al., 2003), due to it being subjected to balance regulation between the activation and suppression of cell death in certain situations (Kaufmann and Hengartner, 2001).

The 3.85 mg/ml and 38.5 mg/ml concentrations that did not present cytotoxicity, also demonstrated anticytotoxic action, increasing the PCE/NCE correlation, significantly reversing the damage caused by cyclophosphamide.

Micronuclei in bone marrow

The mean of micronuclei for each 1000 cells of mice bone marrow subjected to treatment with different concentrations of the aqueous extract of *M. guyanensis*, can be visualized in Fig. 2.

The 3.85 mg/ml, 38.5 mg/ml and 77 mg/ml concentrations did not present mutagenic effects in male and female mice, however, when the total mean was assessed, the 77 mg/ml concentration showed to be mutagenic relative to CN, which was also observed in the 192 mg/ml concentration in male, female and total mean.

The 3.85 mg/ml and 38.5 mg/ml concentrations demonstrated antigenotoxic effects again, acting as antimutagenic, decreasing significantly the number of micronuclei relative to CP.

Discussion

The genotoxic safety and antigenotoxic action of 3.85 mg/ml and 38.5 mg/ml concentrations of the aqueous extract of *M. guyanensis* was already seen in a previous study using *Allium cepa*, where these same concentrations demonstrated anticytotoxic and antimutagenic action relative to meristems germination, mitotic indexes and micronuclei formation (Meneguetti et al., 2014), being also in agreement with Hurtado (2013), in which fractions of *M. guyanensis* showed anti-proliferative activity within a wide period of time, not presenting clastogenic or aneugenic actions, where this latter was also observed in a study carried out by Mendes et al. (2012), demonstrating that the ethanolic extract of *M. rigida* does not induce chromosomal abnormalities.

The antimutagenic action was also observed by *Salmonella/Microsome* test (Ames Test) in which the hydroalcoholic extract of the bark of *M. kruckovii* presented exhibits inhibitory activity against the T98 and T100 lines (Bruni et al., 2006).

Previous studies have demonstrated that the quinone-methide triterpenes are one of the main causes of the antigenotoxic action found in some species of the genus *Maytenus*, acting *in vitro* against tumor cells and against experimental tumors, in which the species *Maytenus ilicifolia* presented inhibitory activities against different sarcomas and neoplastic cells (Santana et al., 1971; Santos-Oliveira et al., 2009), strengthening the results found in the 3.85 mg/ml and 38.5 mg/ml concentrations of the aqueous extract of *M. guyanensis*, that probably occurred due to the presence of quinone-methide

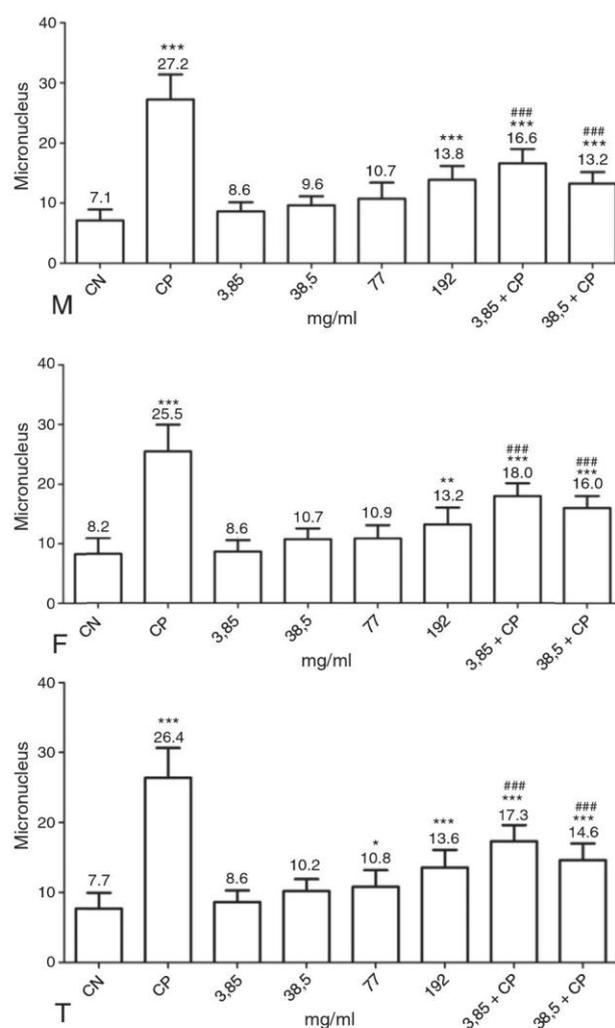


Fig. 2. Mutagenic effect evaluated by the mean of the number of micronuclei in mice bone marrow cells, subjected to treatment with aqueous extract of *M. guyanensis*. M: Males; F: Females; T: Total – Male and Female. Statistically significant for mutagenicity * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$) and *** ($p < 0.001$) when compared to CN. Statistically significant for antigenotoxicity # ($p < 0.05$), ## ($p < 0.01$) and ### ($p < 0.001$) when compared to CP.

triterpenes identified previously in this species (Facundo et al., 2015). Similar results were observed with the tingenone-quinone methide (maitenine) *in vitro* tests that demonstrated inhibition of Leuk-P 138, CA 9KB and V79 neoplastic cell lines (Kupchan and Karim, 1976).

Studies performed in humans with other triterpenes isolated from *Maytenus* ssp. demonstrated the decrease of wounds on the base of the tongue and pharynx by approximately 50%, caused by epidermoid carcinomas and 40% of the lymphoepithelioma with invasion to the orbit, besides positive results in 2 of the 7 patients with uterine epidermoid carcinoma (Santana et al., 1971).

In another clinical series, the triterpene maitenine “tingenone analog” (Morita et al., 2008; Gullo et al., 2012; Facundo et al., 2015), also isolated from the genus *Maytenus*, potentiated other anti-cancerogenic substances of natural sources in eleven patients with advanced basal-cell carcinoma, in which all of the patients presented clinical recovery, with reduction of wound size by more than 50% (Melo et al., 1974; Corsino et al., 2000).

The anti-ulcerogenic effects occurred mainly due to the antioxidant activities of catechine derivatives found in some species of the genus *Maytenus*, and these derivatives act in a more effective

Table 1
Mean \pm standard deviation of the number of Polychromatic Erythrocytes (PCE), Normochromatic Erythrocytes (NCE) and of the PCE/NCE ratio in mice bone marrow cells, which underwent the treatment with aqueous extract of *Maytenus guyanensis*.

Treatment (mg/ml)	Gender	N	(PCE)	(NCE)	Correlation (PCE/NCE)
CN	Male	4	2571 \pm 8.2	2429 \pm 8.2	1.06 \pm 0.07
	Female	4	2616 \pm 5.8	2384 \pm 5.8	1.10 \pm 0.05
	Total	8	2594 \pm 7.5	2406 \pm 7.5	1.08 \pm 0.06
CP	Male	4	1835 \pm 13.6	3165 \pm 13.6	0.58 \pm 0.07***M
	Female	4	1737 \pm 4.7	3262 \pm 4.7	0.53 \pm 0.02***F
	Total	8	1786 \pm 11.3	3214 \pm 11.3	0.56 \pm 0.06***T
3.85	Male	4	2622 \pm 8.1	2377 \pm 8.1	1.10 \pm 0.07
	Female	4	2581 \pm 6.7	2419 \pm 6.7	1.07 \pm 0.06
	Total	8	2602 \pm 7.8	2398 \pm 7.8	1.08 \pm 0.07
38.5	Male	4	2526 \pm 5.8	2474 \pm 5.8	1.02 \pm 0.05
	Female	4	2541 \pm 7.3	2459 \pm 7.3	1.03 \pm 0.06
	Total	8	2534 \pm 6.6	2466 \pm 6.6	1.03 \pm 0.05
77	Male	4	2362 \pm 13.2	2637 \pm 13.2	0.90 \pm 0.09***M
	Female	4	2381 \pm 11.3	2619 \pm 11.3	0.91 \pm 0.08***F
	Total	8	2372 \pm 12.3	2628 \pm 12.3	0.90 \pm 0.09***T
192	Male	4	2161 \pm 11.2	2839 \pm 11.2	0.76 \pm 0.07***M
	Female	4	2165 \pm 9.4	2835 \pm 9.4	0.77 \pm 0.06***F
	Total	8	2163 \pm 10.4	2837 \pm 10.4	0.76 \pm 0.07***T
3.85 + CP	Male	4	2155 \pm 6.6	2845 \pm 6.6	0.76 \pm 0.04***M###M
	Female	4	2194 \pm 7.4	2806 \pm 7.4	0.78 \pm 0.05***F###F
	Total	8	2174 \pm 7.3	2826 \pm 7.3	0.77 \pm 0.04***T###T
38.5 + CP	Male	4	2212 \pm 8.6	2787 \pm 8.6	0.79 \pm 0.05***M###M
	Female	4	2221 \pm 7.9	2779 \pm 7.9	0.80 \pm 0.05***F###F
	Total	8	2217 \pm 8.2	2783 \pm 8.2	0.80 \pm 0.05***T###T

Statistically significant for genotoxicity: *M($p < 0.05$), **M($p < 0.01$) and ***M($p < 0.001$) when compared to male CN. *F($p < 0.05$), **F($p < 0.01$) and ***F($p < 0.001$) when compared to female CN. *T($p < 0.05$), **T($p < 0.01$) and ***T($p < 0.001$) when compared to total CN. Statistically significant for antigenotoxicity: #M($p < 0.05$), ##M($p < 0.01$) and ###M($p < 0.001$) when compared to male CP. #F($p < 0.05$), ##F($p < 0.01$) and ###F($p < 0.001$) when compared to female CP. #T($p < 0.05$), ##T($p < 0.01$) and ###T($p < 0.001$) when compared to total CP.

way on the wound of the digestive tract, inhibiting the damage of mucosa cells by free radicals generated by the very digestive process. This effect is also related to an anti-mutagenic action, protecting against genotoxic agents that may induce the malignant transformation of the intestinal mucosa cells (Krul et al., 2001).

The antioxidant action was already reported for the species *M. guyanensis* (Macari et al., 2006), for *M. procumbens* (Momtaz et al., 2013) and for *ilicifolia* (Macari et al., 2006; Negri et al., 2009) in which the lipid peroxidation is inhibited (Santos-Oliveira et al., 2009) and shows chelant activity of heavy metals, besides acting on different free radicals (Ho et al., 1992; Melo et al., 2001).

In this study, the concentration of 77 mg/ml of the aqueous extract of *M. guyanensis* did not present genotoxic action for the index and frequency of damage evaluated by the comet assay, or for the formation of micronuclei on the bone marrow of male and female mice. On the other hand, it presented genotoxic effects in the total mean of the micronuclei test and also in the ratio PCE/NCE. The negative results for the concentration of 77 mg/ml in the comet assay might have occurred due to analyses of only the acute effects, in which further studies are suggested for a better comprehension of the chronic effects caused by the ingestion of infusions of aqueous extracts of *M. guyanensis*; according to Bode and Dong (2014) several natural compounds found in various plants consumed by traditional population are potential carcinogens or tumor promoters and its use for long periods of time should be avoided.

In the 192 mg/ml concentration the data demonstrated genotoxic effects in all of the tests performed, being in agreement with a study done by Meneguetti et al. (2014), in which the 77 mg/ml and 192 mg/ml concentrations presented cytotoxic and mutagenic actions.

It is important to highlight that 77 mg/ml and 192 mg/ml concentrations are, respectively, twenty- and fifty-fold more concentrated than the concentration normally used by the population: 3.85 mg/ml (Camparoto et al., 2002), bringing a certain tranquility relative to the use of this species in the ethnopharmacology.

This genotoxicity found in high concentrations was not evidenced in other studies using plants of the same genus, in which

the chronic toxicology of the infusion of *M. ilicifolia* was tested in rats and mice with doses ranging from 20 to 40 fold higher than that commonly used by humans, not causing changes in weight, behavior, temperature and in the biochemical parameters of the serum and hematological parameters (Carlini and Frochtengarten, 1988).

In other toxicologic studies, this time acute, performed in mice and rats by infusions and lyophilized extract of *M. ilicifolia*, and toxic effects were not evidenced in doses until 1600-fold higher than the doses used by humans (Santos-Oliveira et al., 2009).

In human beings, a study of clinical toxicology (Phase I trial), administered during 14 days, the double of the dosage of *M. ilicifolia* used in ethnopharmacology, did not observe abnormal results that could be attributed to the plant use. Only symptoms like dry mouth, nausea, and gastralgia in a few volunteers were recorded, with recovery during the study, demonstrating thus that *M. ilicifolia* is not toxic for humans when used in the same way as popular medicine (Carlini and Frochtengarten, 1988).

It was found that aqueous extract of *M. guyanensis* in concentrations up to tenfold higher than the concentration used in ethnopharmacology does not present genotoxic effects and, moreover, it has antigenotoxic actions in mice treated acutely. Further studies of bioaccumulation and chronic effects of this species are suggested in order to improve the understanding of its action mechanisms, ensuring the efficacy and safety of its utilization and development of phytotherapies and drugs.

Authors' contribution

DUOM (doctoral student) participated in all stages of the study, including statistical analysis and writing of the article. RAL (doctoral student), GMP and JBF (graduate student), participated in the preparation of the aqueous extract and article writing. FCS (doctoral student) and RCP contributed in the genotoxic analysis (treatment of animals, comet assay, correlation pce/nce and micronucleus analysis); JSLTM and VAF contributed to supervision and writing the manuscript.

Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

References

- Andrade, S.F., Cardoso, L.G., Bastos, J.K., 2007. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of extract, fractions and populnoic acid from bark wood of *Austroplenckia populnea*. *J. Ethnopharmacol.* 109, 464–471.
- Bode, A.M., Dong, Z., 2014. Toxic phytochemicals and their potential risks for human cancer. *Cancer Prev. Res.* 8, 1–8.
- Borrás, M.R.L., 2003. Plantas da Amazônia: medicinais ou mágicas - Plantas comercializadas no Mercado Municipal Adolpho Lisboa. Editora Valer/Governo do Estado do Amazonas, Manaus.
- Bruni, R., Rossi, D., Muzzoli, M., Romagnoli, C., Paganetto, G., Besco, E., et al., 2006. Antimutagenic, antioxidant and antimicrobial properties of *Maytenus krukovii* bark. *Fitoterapia* 77, 538–545.
- Camparoto, M.L., Teixeira, R.O., Mantovani, M.S., Vicentini, V.E.P., 2002. Effects of *Maytenus ilicifolia* Mart. and *Bauhinia candicans* Benth infusions on onion root-tip and rat bone-marrow cells. *Genet. Mol. Biol.* 25, 85–89.
- Carlini, E.A., Frochtengarten, M.L., Brasília Distrito Federal 1988. Toxicologia clínica (Fase I) da espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*).
- Cechinel-Filho, V., Rosendo, A.Y., 1998. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. *Quím. Nova* 21, 99–105.
- Chavez, H., Valdivia, E., Estevez-Braun, A., Ravelo, A.G., 1998. Structure of new bioactive triterpenes related to 22-B-hidroxy-tingenone. *Tetrahedron* 54, 13579–13590.
- Corsino, J., De Carvalho, P.R., Kato, M.J., Latorre, L.R., Oliveira, O.M.M.F., Araujo, A.R., et al., 2000. Biosynthesis of friedelane and quinone methide triterpenoids is compartmentalized in *Maytenus aquifolium* and *Salacia campestris*. *Phytochemistry* 55, 741–748.
- Duarte, L.P., Vieira Filho, S.A., Silva, G.D.F., Sousa, J.R., Pinto, A.S., 2002. Anti-trypanosomal activity of pentacyclic triterpenes isolated from *Austroplenckia populnea* (Celastraceae). *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 44, 109–112.
- Facundo, V.A., Meneguetti, D.U.O., Militão, J.S.L.T., Lima, R.A., Hurtado, F.B., Casseb, A.A., et al., 2015. Chemical constituents from *Maytenus guianensis* Klotzsch ex Reissek (Celastraceae) Amazon Rainforest. *Biochem. Syst. Ecol.* 58, 270–273.
- Fão, F., Zan, R.A., Brondani, F.M.M., Ramos, L.J., Meneguetti, D.U.O., 2012. Análise do potencial mutagênico da seiva da casca de *Croton lechleri* (Müll. Arg.), no estado de Rondônia, Amazônia ocidental. *SaBios: Rev. Saúde Biol.* 7, 91–98.
- Fonseca, A.P.N.D., Silva, G.D.F., Carvalho, J.J., Salazar, G.D.C.M., Silva, R.P., Jorge, R.M., et al., 2007. Estudo fitoquímico do decocto das folhas de *Maytenus truncata* e avaliação das atividades antinociceptiva, anti-dermatogênica e antiulcerogênica de extratos do decocto. *Quím. Nova* 30, 842–847.
- Giulietti, A.M., Harley, R.M., Queiroz, L.P., Wanderley, M.G.L., Berg, C.V.D., 2005. Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil. *Rev. Megadiver.* 1, 54–61.
- Gonzalez, A.G., Alvarenga, N.L., Estevez-Braun, A., Ravelo, A.G., Bazzocchi, I.L., Mujir, L., 1996. Structure and absolute configuration of triterpene dimers from *Maytenus scutioides*. *Tetrahedron* 52, 9597–9608.
- Gullo, F.P., Sardi, J.C.O., Santos, V.A.F.F.M., Sangalli-Leite, F., Pitangui, N.S., Rossi, S.A., et al., 2012. Antifungal activity of maytenin and pristimerin. *Evid. Based Complement. Altern. Med.* 340787, 1–6.
- Ho, C.T., Chen, Q., Shi, H., 1992. Antioxidative effects of polyphenol extract prepared from various Chinese herbs. *Prev. Med.* 2, 520–525.
- Hurtado, F.B. (Tese) Doutorado em Biologia Experimental 2013. Contribuição ao estudo fitoquímico e biológico da entrecasca da espécie *Maytenus guyanensis* Klotzsch ex Reissek. Fundação Universidade Federal de Rondônia (UNIR), Porto Velho, Rondônia.
- Kaufmann, S.H., Hengartner, M.O., 2001. Programmed cell death: alive and well in the new millennium. *Trends Cell Biol.* 11, 526–534.
- Krishna, G., Hyashi, M., 2000. *In vivo* rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mutat. Res.* 455, 155–166.
- Krul, C., Luiten-Schuite, A., Tenfelde, A., Ommen, B., Verhagen, H., Havenaar, R., 2001. Antimutagenic activity of green tea and black tea extracts studied in a dynamic *in vitro* gastrointestinal model. *Mutat. Res.* 474, 71–85.
- Kupchan, S.M., Karim, A., 1976. Tumor inhibitors. 114. Aloe emodin: antitumorigenic principle isolated from *Rhamnus frangula* L. *Lloydia* 39, 223–224.
- Macari, P.A.T., Portela, C.N., Celani, F.B., Pohlit, A.M., 2004. Isolamento de um flavonóide da casca de *Maytenus guyanensis*. XXVI Reunião Anual sobre Evolução, Sistemática e Ecologia Micromoleculares. Instituto de Química, Universidade Federal Fluminense.
- Macari, P.A.T., Portela, C.N., Pohlit, A.M., 2006. Antioxidant, cytotoxic and UVB-absorbing activity of *Maytenus guyanensis* Klotzsch (Celastraceae) bark extracts. *Acta Amaz.* 36, 513–518.
- Magalhães, E.A., Silva, J.G.J., De-Campos, T.A., Silva, L.P., Silva, R.M.G., 2010. Avaliação do potencial genotóxico do extrato bruto de *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers, Bignoneaceae, em medula óssea de camundongos. *Rev. Bras. Farmacogn.* 20, 65–69.
- Melo, A.M., D'Albuquerque, I.L., Lacet, Y., 1974. Primeiras observações do uso tóxico de primina, plumbagina e maitenina em pacientes com câncer de pele. *Rev. Inst. Antibiot.* 14, 9–16.
- Melo, S.F., Soares, S.F., Costa, R.F., Da-Silva, C.R., Oliveira, M.B.N., Bezerra, R.J.A.C., et al., 2001. Effect of the *Cymbopogon citratus*, *Maytenus ilicifolia* and *Baccharis genistelloides* extracts against the stannous chloride oxidative damage in *Escherichia coli*. *Mutat. Res.* 496, 33–38.
- Mena-Rejón, G.J., Pérez-Espadas, A.R., Moo-Puc, R.E., Cedillo-Rivera, R., Bazzocchi, I.L., Jiménez-Díaz, I.A., Quijano, L., 2007. Antigiardial activity of triterpenoids from root bark of *Hippocratea excelsa*. *J. Nat. Prod.* 70, 863–865.
- Mendes, S.S., Andrade, J.A., Xavier, M.A., Secundo, J.J.A., Pantaleão, S.M., Estevam, C.S., et al., 2012. Genotoxicity test of *Maytenus rigida* and *Aristolochia birostris* in the radical meristem of the onion, *Allium cepa*. *Rev. Bras. Farmacogn.* 22, 76–81.
- Meneguetti, D.U.O., Lima, R.A., Silva, J.B., Silva, R.P., Pagotto, R.C., Facundo, V.A., 2014. Análise citotóxica e mutagênica do extrato aquoso de *Maytenus guyanensis* Klotzsch ex Reissek (Celastraceae) chichuá (xixuá) amazônico. *Ciê. Nat.* 36, 301–309.
- Momtaz, S., Hussein, A.A., Ostad, S.N., Abdollahi, M., Lall, N., 2013. Growth inhibition and induction of apoptosis in human cancerous HeLa cells by *Maytenus procumbens*. *Food Chem. Toxicol.* 51, 38–45.
- Morita, H., Hirasawa, Y., Muto, A., Yoshida, T., Sekita, S., Shirota, O., 2008. Antimitotic quinoid triterpenes from *Maytenus chuchuhuasca*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 18, 1050–1052.
- Negri, M.L.S., Possamai, J.C., Nakashima, T., 2009. Atividade antioxidante das folhas de espinheira-santa - *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss., secas em diferentes temperaturas. *Rev. Bras. Farmacogn.* 19, 553–556.
- Nesslany, F., Brugier, S., Mouries, M.A., Curieux, F., Marzin, D., 2004. *In vitro* and *in vivo* chromosomal aberrations induced by megazol. *Mutat. Res.* 560, 147–158.
- Ouanes, Z., Abid, S., Ayed, I., Anane, M.T., Creppy, E.E., Bacha, H., 2003. Induction of micronuclei by Zearalenone in Vero monkey kidney cells and in bone marrow cells of mice: protective effect of Vitamin E. *Mutat. Res.* 538, 63–70.
- Prata, R.R., Dissertação (mestrado) 2007. Aspectos anatômicos e etnofarmacológicos do caule e raiz de *Maytenus guyanensis* Klotzsch ex Reissek (Celastraceae). INPA/UFAM, Manaus.
- Prata, R.R., Mendonça, M.S., 2009. Estudo anatômico do xilema secundário da raiz e do caule de *Maytenus guyanensis* Klotzsch ex Reissek (Celastraceae). *Acta Amaz.* 39, 261–266.
- Revilla, J., 2002. Apontamentos para a cosmética amazônica. SEBRAE-AM/INPA, Manaus.
- Revilla, J., 2001. Plantas da Amazônia – oportunidades econômicas e sustentáveis. SEBRAE-AM/INPA, Manaus.
- Ribeiro, I.R., Salvadori, D.M.F., Marques, E.K., 2003. *Mutagênese Ambiental*. Ed Ulbra, Canoas.
- Santana, C.F., Asfora, J.J., Cotias, C.T., 1971. Primeiras observações sobre o emprego da maitenina em pacientes cancerosos. *Rev. Inst. Antibiot.* 11, 37–49.
- Santos-Oliveira, R., Coulaud-Cunha, S., Colaço, W., 2009. Revisão da *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek, Celastraceae. Contribuição ao estudo das propriedades farmacológicas. *Rev. Bras. Farmacogn.* 19, 650–659.
- Shahrim, Z., Baharuddin, P.J.N.M., Yahya, A., muhammad, H., Bakar, R.A., Ismail, Z., 2006. The *in vivo* rodent micronucleus assay of *Kacip Fatimah* (*Labisia pumila*) extract. *Trop. Biomed.* 23, 214–219.
- Silva, F.C., Barros, M.A.B., Viana, R.R., Romão, N.F., Oliveira, M.S., Meneguetti, D.U.O., 2011. Avaliação de mutagênese provocada por sulfato de ferro através do teste micronúcleo em células da medula óssea de camundongos. *Rev. Cie. Fac. Edu. Mei. Amb.* 2, 13–21.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Scheneider, A., 1988. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175, 184–191.
- Sousa, J.R., Pinheiro, J.A., Ribeiro, E.F., Souza, E., Maia, J.G.S., 1986. A sesquiterpene evoninoate alkaloid from *Maytenus guianensis*. *Phytochemistry* 25, 1776–1778.
- Tice, R.R., Agurell, E., Anerson, B., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., et al., 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.* 35, 206–210.
- Villela, I.V., LAU, A., Silveira, J., Prá, D., Rolla, H.C., Silveira, J.D., 2003. Bioensaios para o monitoramento de genotoxicidade ambiental. In: Silva, J., Erdtmann, B., Henriques, J.A.P. (Eds.), *Genética Toxicológica*. Alcance, Porto Alegre.

ANEXOS IV

Arigo Publicado no Biochemical Systematics and Ecology – Journal



Contents lists available at ScienceDirect

Biochemical Systematics and Ecology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biochemsyseco

Chemical constituents from *Maytenus guianensis* Klotzsch ex Reissek (Celastraceae) Amazon rainforest



Valdir Alves Facundo ^{a,*}, Dionatas Ulises de Oliveira Meneguetti ^a,
 Júlio Sancho Linhares T. Militão ^a, Renato Abreu Lima ^a,
 Fernanda Bay Hurtado ^a, Almeida Andrade Casseb ^a, Leda Fabíola Teixeira ^a,
 Isadora do Carmo da Silva ^a, Gil Valdo Jose da Silva ^b, Valdemar Lacerda Junior ^c

^a Department of Chemistry, Federal University of Rondônia, Porto Velho 76801–059, RO, Brazil

^b Department of Chemistry, Faculty of Philosophy, Sciences and Letters of Ribeirão Preto (FFCLRP), USP, 14040-901 Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

^c Department of Chemistry, Center of Exact Sciences, Federal University of Espírito Santo, 29060-900 Vitória, ES, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 September 2014

Accepted 15 November 2014

Available online

Keywords:

Maytenus guianensis

Triterpenes

Celastraceae

Friedo-nor-oleanane

ABSTRACT

The present phytochemical investigation on *Maytenus guianensis* led to the isolations of nine triterpenes, including friedelanes, *friedo-nor-oleanane*, oleanane and ursane and one steroid. All of them were isolated from this plant for the first time. The presences of *friedo-nor-oleanane* triterpenoids might be employed as the common characteristic constituents of both Hippocrateaceae and Celastraceae family.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Subject and source

The genus *Maytenus* belongs to Celastraceae family and consists of about 850–1300 species, which are distributed worldwide, particularly in subtropical and tropical regions, China, Africa, Paraguay, Brazil, Argentina and Uruguay and in southern regions of Saudi Arabia (Mohamed and Perwez, 2014). *Maytenus guianensis* Klotzsch ex Reissek is known popularly in Brazilian Amazon rainforest as “chichuá” and has been used as a medicinal plant in the treatment of inflammation, contraceptive, cancer, aphrodisiac, anti-rheumatic agents (Prata and Mendonça, 2009; Macari et al., 2006). Stem bark and leaves of *M. guianensis* were collected in February 2009 in Manaus, Amazônia, Brazil. The plant was identified by Dr. Cid Ferreira of the Amazon Research Institute (INPA), where a voucher specimen was deposited under No. 188.485.

2. Previous work

The *Maytenus* genus has been widely studied with numerous compounds isolated from the various species. *Maytenus* species are known to elaborate sesquiterpenes, *friedo-nor-oleanane* triterpenes, sesquiterpene pyridine alkaloids, flavonoids

* Corresponding author.

E-mail address: vfacundo@unir.br (V.A. Facundo).

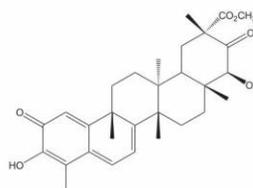
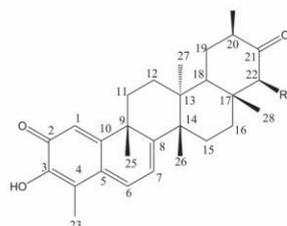
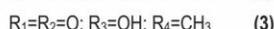
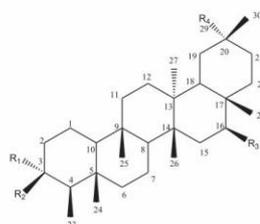
and tannins and phenolic acids (Martins et al., 2012; Da Silva et al., 2008; Lhinhatrakool et al., 2011; De Souza et al., 1986). Previous phytochemical investigations of the roots *Maytenus guianensis* have reported the presence of 4'-O-methyl-(–)-epi-gallocatechin, proanthocyanidin A, dulcitol, β -sitostenone, friedelan-3,7-dione, *N,N*-dimethylserine and mayteine (De Sousa et al., 1986).

3. Present study

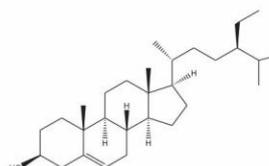
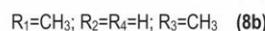
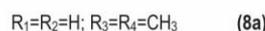
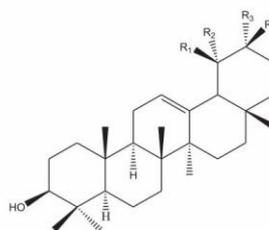
The stem barks of *M. guianensis* (1.9 kg) were extracted three times with acetone (3L \times 3) at room temperature. The extracts were filtered and evaporated to dryness under reduced pressure to give the corresponding residues (MGCA) in amounts of 200.0 g. A portion of the MGCA (60.0 mg) was flash chromatographed using a hexane-acetone gradient elution system. Fractions (75 ml) were collected and monitored by thin layer chromatography (TLC), using hexane-acetone mixtures of increasing polarity. Fractions 3–5 (eluent: hexane-acetone, 80:20) furnished a residue (62.2 mg) which was submitted to flash chromatography using hexane and acetone as mobile phase to afford **(1)** (25.1 mg, eluent: hexane-acetone, 95:05) and **(2)** (33.2 mg, eluent: hexane-acetone 90:10). Fractions 13–85 (eluent: hexane-acetone, 8.5:1.5) were combined according to their TLC analysis to afford the sub fraction A (736.0 mg). This sub fraction A was further chromatographed over silica gel eluted with mixtures of hexane:acetone of increasing polarity to afford **(3)** (19.9 mg, eluent: hexane-acetone, 90:10), **(4)** (51.0 mg, eluent: hexane-acetone, 75:25), **(5)** (33.40 mg, eluent: hexane-acetone, 70:30), **(6)** (51.0 mg, eluent: hexane-acetone, 60:40) and **(7)** (35.0 mg, eluent: hexane-acetone, 55:45).

The leaves of *M. guianensis* (1.9 kg) were extracted with 95% EtOH (3 \times 2.0 L) at room temperature. The extracts were concentrated, defatted with *n*-hexane and partitioned with EtOAc. The hexane layer was concentrated (6.0 g) and chromatographed on silica gel column (50.0 g), eluting with *n*-hexane, and subsequently, with *n*-hexane:CHCl₃ mixtures of increasing polarity. Twelve fractions of 60 mL each were collected. From these fractions, compounds **(8)**, 27.0 mg) and **(9)**, 31.9 mg) were obtained and further purified by recrystallisation with ethyl ether.

The structures of all isolated compounds were elucidated by analysis of their spectral data (IR, MS, ¹H and ¹³C NMR, including COSY, HMQC, HMBC and NOESY) and by comparison with the literature data. They were identified as friedelin **(1)** (Almeida et al., 2011), friedelinol **(2)** (Almeida et al., 2011), 16 β -hydroxyfriedelin **(3)** (Duarte et al., 2009), 29-hydroxyfriedelin **(4)** (Betacor et al., 1980), tingenone **(5)** (Sotanaphun et al., 1998), 22 β -hydroxytingenone **(6)** (Lee et al., 2004) and 22 β -hydroxypristimerin **(7)** (Jeller et al., 2004). The compound **(8)** was identified with a mixture of β -amyrin **(8a)** and α -amyrin **(8b)** (Dias et al., 2011), and **(9)** as β -sitosterol (Facundo et al., 2008).



(7)



(9)

4. Chemotaxonomic significance

The family Celastraceae is well represented in Brazil by four genera *Maytenus* Klotzsch ex Reissek, *Austroplenckia* Lund, *Gououppia* Reissek and *Fraunhoferia* Mart (Carvalho-Okano, 1992). The genus *Maytenus*, which includes more than 225 worldwide-distributed species, is one of the most representative of this family (Almeida et al., 2010). About 80 species distributed in the Brazilian territory are currently recognized (Joffily and Vieira, 2005). Phytochemical study of the root bark from *M. guianensis* have reported the presence of epicallocatchin, proanthocyanidin, esterooids, triterpenes and sesquiterpene alkaloids (De Sousa et al., 1986).

This phytochemical investigation in stem bark of *M. guianensis* led to isolation and identification of nine triterpenes, four friedelanones (1), (2), (3) and (4) one oleanane (8a), one ursane (8b), three *friedo-nor*-oleanane (5), (6), (7), and one steroid, β -sitosterol (9), for the first time identified from this plant. Compounds (1), (2), (3), (4), (8a), (8b) and (9) have been previously obtained from several species of the genus *Maytenus* such as *Maytenus distichophylla* (1, 2 and 4), (Duarte et al., 2013), *Maytenus obtusifolia* (1 and 4) (Da Silva et al., 2008), *Maytenus umbellata* (8a) (Gonzales et al., 1986), *Maytenus gonoclada* (1 and 2) (Silva et al., 2011), *Maytenus robusta* (1, 2 and 4), (Sousa et al., 2012), *Maytenus phyllanthoides* (8a and 8b) (Moo-Puca et al., 2014), *Maytenus diversifolia* (1, 3 and 8a) (Nozahi et al., 1986).

The *friedo-nor*-oleanane derivatives are members of a small group of natural products, which are typical from the closely related families Celastraceae and Hippocrateaceae (Corsino et al., 2000). Tingenone (5) was reported from *Maytenus acanthophylla* (De Oliveira et al., 2006), *Maytenus mekongensis* (Linhatrakool et al., 2011), *Maytenus imbricate* (Rodrigues et al., 2012), *Maytenus ilicifolia* (Santos et al., 2010), *Maytenus vitis-idaea* (Almeida et al., 2010), *Tripterygium regelii* (Celestraceae) (Ryu et al., 2010), *Hippocratea excelsa* (Celestraceae) (Gonzado et al., 2007), *Cheiloclinium cognatum* (Hippocrateaceae) (Liao et al., 2008), *Salacia campestris* (Hippocrateaceae) (Carvalho et al., 2005) and 22 β -hydroxytingenone (6) was reported from *Maytenus retusa* (Oramas et al., 2010), *Maytenus chuchuhuasca* (Morita et al., 2008), *M. ilicifolia* (Buffa-Filho et al., 2002), *Maytenus aquifolium* (Corsino et al., 2000), *Elaeodendron croceum* (Celestraceae) (Yelani et al., 2010), *Elaeodendron schlechteranum* (Celestraceae) (Maregesi et al., 2010), *Gliptopetalum sclerocarpum* (Celestraceae) (Sotanaphun et al., 1998), *Salacia chinensis* (Hippocrateaceae) (Corsino et al., 2000), *Salacia campestris* (Hippocrateaceae) (Corsino et al., 2000).

22 β -Hydroxypristimerin (7) has been previously obtained from *Cheiloclinium cognatum* (Hippocrateaceae) (Jeller et al., 2004). Interesting to note is that 22 β -hydroxypristimerin (7) was isolated herein for the first time from the family Celastraceae, although previously it was reported to be isolated from Hippocrateaceae family. This finding leads to the conclusion that these *friedo-nor*-oleanane derivatives, structurally characterized by the AB ring, are systematically important and can be as a common characteristic components of both families and Hippocrateaceae Celastraceae.

Acknowledgements

The authors wish to thank Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico for financial support and to National Institute for Research in the Amazon (INPA), Manaus, Brazil, for identification of plant material.

References

- Almeida, M.F.O., Melo, A.C.R., Pinheiro, M.L.B., Silva, J.R.A., Souza, A.D.L., Barison, A., Campos, F.R., Amaral, A.C.F., Machado, G.M.C., Leon, L.P., 2011. *Quím. Nova* 34, 1182.
- Almeida, M.T.R., Luci, C.R., Padrón, J.M., Palermo, J.A., 2010. *Phytochemistry* 71, 1741.
- Betacor, C., Freire, R., Gonzales, A.G., Salazar, J.A., Pascard, C., Prange, 1980. *Phytochemistry* 19, 1989.
- Buffa-Filho, W., Corsino, J., Bolzani, V.S., Furlan, M., Pereira, A.M.S., Franca, S.C., 2002. *Phytochem. Anal.* 13, 75.
- Carvalho-Okano, R.M., 1992. Estudos taxonômicos do Gênero *Maytenus* Mol. emend. Mol (Celastraceae) do Brasil extra amazônico. Tese de doutorado, Instituto de Biologia, Unicamp, Campinas, São Paulo, Brasil.
- Carvalho, P.R.F., Silva, D.H.S., Bolzani, V.S., Furlan, M., 2005. *Chem. Biodivers.* 2, 367.
- Corsino, J., Carvalho, P.R.F., Kato, M.J., Latorre, L.R., Oliveira, O.M.M.F., Araujo, A.R., Bolzani, V.S., Franca, S.C., Pereira, A.M.S., Furlan, M., 2000. *Phytochemistry* 55, 741.
- Da Silva, M.S., Sousa, D.P., Medeiros, V.M., Folly, M.A.B., Tavares, J.F., Barbosa-Filho, J.M., 2008. *Biochem. Syst. Ecol.* 36, 500.
- De Oliveira, D.M., Silva, G.D.F., Duarte, L.P., Vieira-Filho, S.A., 2006. *Biochem. Syst. Ecol.* 34, 661.
- De Sousa, J.R., Pinheiro, J.A., Ribeiro, E.F., De Souza, E., Maia, J.G.S., 1986. *Phytochemistry* 25, 1776.
- Dias, M.O., Hamerski, L., Pinto, A.C., 2011. *Quím. Nova* 34, 704.
- Duarte, L.P., Miranda, R.R.S., Rodrigues, S.B.V., Silva, G.D.F., Vieira-Filho, S.A., Knupp, V.F., 2009. *Molecules* 14, 598.
- Duarte, M.C., Tavares, J.F., Madeiro, S.A., Costa, V.C.O., Barbosa-Filho, J.M., Agra, M.F., Braz-Filho, R., Silva, M.S., 2013. *J. Braz. Chem. Soc.* 24, 1697.
- Facundo, V.A., Polli, A.R., Rodrigues, R.V., Militão, J.S.L.T., Stabelli, R.G., Cardoso, C.T., 2008. *Acta Amaz.* 38, 733.
- Gonzado, M.R.J., Espadas, A.R.P., Puc, R.E.M., Rivera, R.B.C., Diaz, B.I.A.J., Quijano, L., 2007. *J. Nat. Prod.* 70, 863.
- Gonzales, A.G., Lopes, I., Ferro, E.A., Ravelo, A.G., Gutierrez, J., Aguiar, M.A., 1986. *Biochem. Syst. Ecol.* 14, 479.
- Jeller, A.H., Silva, D.H.S., Liao, L.M., Bolzani, V.S., Furlan, M., 2004. *Phytochemistry* 65, 1977.
- Joffily, A., Vieira, R.C., 2005. *Acta Bot. Bras.* 19, 549.
- Lee, B.W., Seo, W.D., Gal, S.W., Yang, M.S., Park, K.H., 2004. *Agric. Chem. Biotechnol.* 47, 77.
- Liao, L.M., Silva, G.A., Monteiro, M.R., Albuquerque, S., 2008. *Z. Naturforsch.* 63, 207.
- Linhatrakool, T., Prabpai, S., Kongsaree, P., Sutthivaiyakit, S., 2011. *J. Nat. Prod.* 74, 1386.
- Macari, P.A.T., Portela, C.N., Pohlit, A.M., 2006. *Acta Amaz.* 36, 513.
- Maregesi, S.M., Hermans, N., Dhooche, L., Cimanga, K., Ferreira, D., Pannecouque, C., Derghe, D.A.V., Cos, P., Maes, L., Vlietinck, A.J., Apers, S., Pieters, L., 2010. *J. Ethnopharm.* 129, 319.
- Martins, M.V., Estevam, C.S., Santos, A.L.L., Dias, A.S., Silva, Y.K.C., Esteves, C.S., Santos, A.L.L.M., Dias, A.S., Araujo-Junior, J.X., Miranda, A.L., Barreto, E.J., Pizza, C., Piacente, S., Montoro, P., Quintas-Junior, L.J., Araujo, B.S., Moreira, M.S.A., Sant'Ana, A.E.G., 2012. *Rev. Bras. Farmacogn.* 22, 598.
- Mohamed, F.A., Perwez, A., 2014. *Asian Pac J. Trop. Biomed.* 4, 152.

- Moo-Puca, J.A., Quintela, Z.M., López, G.M., Moo-Puca, R.E., Quijanoc, L., 2014. *Quím. Nova* 37, 85.
- Morita, H., Hirasawa, Y., Muto, A., Yoshida, T., Sekita, S., Shiota, O., 2008. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 18, 1050.
- Nozahi, H.H., Uzljkit, H., Irayamar, E., Kasal, Y., Wu, R.Y., Lee, H.K., 1986. *Phytochemistry* 25, 479.
- Oramas, R.S.M., Chavez, H., Martins, R.P., Perez, L.F., Ravelo, A.G., Braun, A.E., 2010. *J. Nat. Prod.* 73, 2029.
- Prata, R.R., Mendonça, M.S., 2009. *Acta Amaz* 39, 261.
- Rodrigues, V.G., Duarte, L.P., Silva, G.D.F., Silva, F.C., Goes, J.V., Takahashi, J.A., Pimenta, L.P.S., Vieira-Filho, S.A., 2012. *Quím. Nova* 35, 1375.
- Ryu, Y.B., Park, S.J., Kim, Y.M., Lee, J.Y., Seo, W.D., Chang, J.S., Park, K.H., Rho, M.C.I., Lee, W.S., 2010. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 20, 1873.
- Santos, M., Formenton, V.A.F., Santos, P.D., Castro, G.L., Zannoni, M.V.B., Furlan, M., 2010. *Molecules* 15, 6956.
- Silva, F.C., Duarte, L.P., Silva, G.D.F., Veira-Filho, S.A., Lula, I.S., Takahashic, J.A., Sallumc, W.S.T., 2011. *J. Braz. Chem. Soc.* 22, 943.
- Sotanaphun, U., Suttisri, R., Lipipun, V., Bavovada, R., 1998. *Phytochemistry* 49, 1749.
- Sousa, G.F., Duarte, L.P., Alcantara, A.F.C., Silva, G.D., Vieira-Filho, S.A., Silva, R.R., Oliveira, D.M., Takahashi, J.A., 2012. *Molecules* 17, 13439.
- Yelani, T., Hussein, A.A., Meyer, J.J.M., 2010. *Nat. Prod. Res.* 24, 1418.

ANEXO V

Autorização da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Fundação Oswaldo Cruz
Rondônia (Fiocruz – RO)



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ RONDÔNIA

Rua da Beira, 7671 BR364 Km 3,5, CEP 76812-245, Porto Velho, RO, Brazil
Telefone: (55) (69) 3219-6010 - Fax: (55) (69) 3219-6000

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto (protocolo 2013/12) intitulado “Análise *in vitro* da bioatividade de extratos naturais isolados de *Maytenus guyanensis* (Celastraceae) contra cepas de *Plasmodium falciparum*, *Leishmania amazonensis* e veneno de serpentes amazônicas”, sob a responsabilidade do Dr. Valdir Facundo está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela Comissão de ética no uso de Animais da Fundação Oswaldo Cruz Rondônia (CEUA FIOCRUZ RONDÔNIA), em 03 de outubro de 2013.

This is to certify that the work (protocol 2013/12) entitled “*In vitro* analysis of natural extracts bioactivity isolated from *Maytenus guyanensis* Klotzsch ex Reissek (Celastraceae) against strains of *Plasmodium falciparum*, *Leishmania amazonensis* and Amazon snake venom”, by Dr. Valdir Facundo is in accordance with the Ethic Principles in Animal Experimental and was approved by Ethic Commission for the Use of Animals of the Oswaldo Cruz Rondônia Foundation (CEUA FIOCRUZ RONDÔNIA), October 03, 2013.

Porto Velho, 03 de outubro de 2013.

Dra. Juliana Pavan Zuliani (Presidente CEUA FIOCRUZ RONDÔNIA)
Ms. Luiz Herman Soares Gil
Dr. Andreimar M. Soares
Dr. Roberto Nicoleti
Tatiane Matzkeit

ANEXO VI
Conselho de Gestão do Patrimônio Genético - CGEN



Número do Processo: 010762/2014-0
 Nome: Valdir Alves Facundo
 Data Envio: 08/10/2014 13:20:22
 Setor: COAPG/DABS
 CA: 68



IDENTIFICAÇÃO - PROJETO

NÚMERO DO PROCESSO	LINHA DE FOMENTO/CHAMADA
010762/2014-0	Patrimônio Genético / Autorização de Acesso ao PG (Pesquisa Científica)
COMITÊ ASSESSOR	
68 - PROGRAMA DE BIODIVERSIDADE	
ÁREA DE CONHECIMENTO	
Química dos Produtos Naturais	
MODALIDADE CONTRATAÇÃO	CA DE JULGAMENTO
Individual	68 - PROGRAMA DE BIODIVERSIDADE



DADOS DO SOLICITANTE

PROPONENTE	CPF	TITULAÇÃO MÁXIMA
Valdir Alves Facundo	144.120.123-87	Doutorado
DATA DE NASCIMENTO	SEXO	E-MAIL
17/09/1956	Masculino	vfacundo@unir.br
END RESIDENCIAL	TELEFONE RESIDENCIAL	NACIONALIDADE
Rua Das Mangueiras 1221 - Porto Velho RO	69 - 32276065	Brasileiro
FAX		
INSTITUIÇÃO PROPONENTE		
UNIR - Universidade Federal de Rondônia (Avenida Presidente Dutra, 2965 Porto Velho) reitoria@unir.br		
ÁREA DE ATUAÇÃO DO PROPONENTE		
- Ciências Exatas e da Terra/Química dos Produtos Naturais - Ciências Exatas e da Terra/Química Orgânica		



INSTITUIÇÕES - PROJETO

FUNÇÃO	NOME
Parceria/Cooperação	UTFPR - Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Acesso da Amostra	UNIR - Universidade Federal de Rondônia
Vínculo Institucional	UNIR - Universidade Federal de Rondônia
Parceria/Cooperação	UFES - Universidade Federal do Espírito Santo
Executora/Sede	UNIR - Universidade Federal de Rondônia
Parceria/Cooperação	USP - Universidade de São Paulo



DADOS GERAIS - PROJETO

TÍTULO		
CONHECIMENTO QUÍMICO DAS DIVERSAS CLASSES DE SUBSTÂNCIAS PRODUZIDAS PELO METABOLISMO SECUNDÁRIO DE PLANTAS NATIVAS E CULTIVADAS NA REGIÃO AMAZÔNICA		
SIGLA	DATA DE INÍCIO	DURAÇÃO
	01/11/2014	60 mês(es)
PALAVRAS CHAVE		HOME PAGE DO PROJETO
Piperaceae; fabaceae; Combretaceae.; Euforbiaceae; fitoquímica;		
RESUMO NÃO SIGILOSO		
Este trabalho tem como principal objetivo obter o conhecimento fitoquímico das diversas classes de substâncias produzidas pelo metabolismo secundário de plantas nativas e cultivadas na região amazônica. Serão estudadas 31 plantas, sendo 17 do gênero Piper; quatro do gênero Copaifera; duas do gênero Croton; uma do gênero Combretum; uma do gênero Maytenus; uma do gênero Spondias; uma do gênero Carapa; uma do gênero Vatairea; uma do gênero Momordica; uma do gênero Plectranthuse uma do gênero Curcuma.		
OBJETIVO		
Este trabalho tem como principal objetivo obter o conhecimento fitoquímico das diversas classes de substâncias produzidas pelo metabolismo secundário de plantas nativas e cultivadas na região amazônica.		


INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES - BIODIVERSIDADE
TIPO

- Acesso
- Remessa
- Transporte
- Coleta

COMPONENTES DO PATRIMÔNIO GENÉTICO A SEREM ACESSADOS (GRUPOS TAXONÔMICOS):

17 do gênero Piper; quatro do gênero Copaifera; duas do gênero Croton; uma do gênero Combretum; uma do gênero Maytenus; uma do gênero Spondias; uma do gênero Carapa; uma do gênero Vatareae; uma do gênero Momordica; uma do gênero Plectranthuse uma do gênero Curcuma.

INDICAR PREVISÃO DE COLETA DE ESPÉCIES AMEAÇADAS DE EXTINÇÃO DE ENDEMISMO ESTRITO (IDENTIFICAR ESPÉCIES):

Não existem dados sobre ameaças de extinção das espécies selecionadas

TIPO / QUANTIDADE DE AMOSTRA
REQUER SIGILO DE ALGUMA INFORMAÇÃO

Amostras de plantas: galhos, folhas, raízes e flores - cerca de 2 quilos cada; Extratos das partes coletadas: estimados em 500g de cada Substâncias e suas misturas: cerca de 10mg, sem previsão do número a ser obtido no decorrer do trabalho.

Não

LOCALIZAÇÕES DE COLETA

UF	MUNICÍPIO	LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA	ÁREA	COLETA
RO	Porto Velho	8°45'40.21"S 63°54'1.65"W	Pública	in situ
RO	Vilhena	12°45'2.14"S 60° 8'57.70"W	Pública	in situ
AM	Boca do Acre	8°45'5.97"S 67°23'54.70"W	Pública	in situ
RO	Guajara-Mirim	10°47'21.03"S 65°19'48.92"W	Pública	in situ


FONTES DE FINANCIAMENTOS

NOME	VALOR	PROCESSO
CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico	603.870,00	405277/2013-0


ÁREAS DO CONHECIMENTO - PROJETO

Química dos Produtos Naturais


DOCUMENTOS ANEXOS

Projeto de Pesquisa http://anexosform.cnpq.br/doc/Biodiversidade/8/8148419540710327_01.pdf


EQUIPE - PROJETO

NOME	FUNÇÃO NO PROJETO	TITULAÇÃO MÁXIMA	ÁREAS DE ATUAÇÃO	
Almeida Andrade Casseb	Pesquisador	Doutorado	<ul style="list-style-type: none"> - Ciências Biológicas/Imunidade Inata (Genes da Família TLR) - Ciências Biológicas/Hemoglobinopatias - Ciências Biológicas/Genética Humana e Médica - Ciências Biológicas/Genética de Populações - Ciências Biológicas/Genética Molecular e de Microorganismos 	
CPF	DATA DE NASCIMENTO	PAÍS DE NASCIMENTO	EMAIL	NACIONALIDADE
479.380.482-91	22/10/1974	Brasil	almeidacasseb@globo.com	Brasileiro
NOME	FUNÇÃO NO PROJETO	TITULAÇÃO MÁXIMA	ÁREAS DE ATUAÇÃO	
Júlio Sancho Linhares Teixeira Militão	Pesquisador	Doutorado	<ul style="list-style-type: none"> - Ciências Exatas e da Terra/Química dos Produtos Naturais - Ciências Exatas e da Terra/Evolução, Sistemática e Ecologia Química - Ciências Exatas e da Terra/Software Básico - Ciências Exatas e da Terra/Estrutura, Conformação e Estereoquímica 	
CPF	DATA DE NASCIMENTO	PAÍS DE NASCIMENTO	EMAIL	NACIONALIDADE
144.200.233-68	20/03/1960	Brasil	militao@unir.br	Brasileiro

NOME	FUNÇÃO NO PROJETO	TITULAÇÃO MÁXIMA	ÁREAS DE ATUAÇÃO	
Valdir Alves Facundo	Coordenador	Doutorado	- Ciências Exatas e da Terra/Química dos Produtos Naturais - Ciências Exatas e da Terra/Química Orgânica	
CPF	DATA DE NASCIMENTO	PAÍS DE NASCIMENTO	EMAIL	NACIONALIDADE
144.120.123-87	17/09/1956	Brasil	vfacundo@unir.br	Brasileiro

**DECLARAÇÃO**

Ao encaminhar este formulário ao CNPq o solicitante, na qualidade de Coordenador do Projeto, declara formalmente ter conhecimento da Convenção sobre Diversidade Biológica, da Medida Provisória n.º 2.186-16/2001, dos Decretos n.º 3.945/2001 e n.º 4.946/2003, das deliberações do CGEN e dos requisitos do CNPq (disponível em [Resolução Normativa CNPq nº003/2012](#)). Declara, também, concordar com o [Termo de Compromisso](#) e que a presente solicitação de Autorização de Acesso e/ou Remessa de Amostra de Componente do Patrimônio Genético é única e exclusivamente para fins de pesquisa científica, estando ciente que o descumprimento das condições aqui estabelecidas sujeita o infrator às sanções previstas na legislação vigente.

(Declaração feita em observância aos artigos 297-301 do [Código Penal Brasileiro](#)).

NOME	CPF
Valdir Alves Facundo	144.120.123-87

Declaração registrada eletronicamente através da internet junto ao CNPq, mediante uso de senha pessoal do solicitante em 08/10/2014 13:20:22, sob o número de protocolo 8148419540710327

----- Mensagem encaminhada -----

De: **Cnpq** <coapg@cnpq.br>

Data: 17 de novembro de 2014 18:22

Assunto: [010762/2014-0] - e-Fomento - CNPq - Decisão sobre a proposta de Acesso ao Patrimônio Genético

Para: vfacundo@unir.br

Cc: calderon@fiocruz.br, coapg@cnpq.br

Prezado(a) Pesquisador(a),

Comunicamos que está disponível na Plataforma Carlos Chagas a decisão do Gestor Institucional de sua instituição de vínculo sobre a solicitação de Acesso a Componente do Patrimônio Genético.

Decisão: Favorável

Justificativa: O referido projeto é uma correção de proposta anterior aprovada pela instituição

Na sequência, em caso de decisão favorável, a solicitação será analisada pelo CNPq. Se o formulário on-line estiver corretamente preenchido e o projeto a ele anexado contiver as informações exigidas pela legislação, a solicitação irá à deliberação da Diretoria Executiva do CNPq, cuja decisão lhe será comunicada por e-mail. Contudo, em caso de decisão desfavorável, a solicitação será encerrada, devendo outra ser formulada, caso seja de seu interesse.

Atenciosamente,

Coordenação do Sistema de Autorização de Acesso ao Patrimônio Genético

ANEXO VII

Resumo Publicado no 50º Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical
(MedTrop)

Anais

50º Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical

ÁREA TEMÁTICA: F) DOENÇAS POR PROTOZOÁRIOS

P-093

TÍTULO: ATIVIDADE ANTIPLASMODIAL DA FRAÇÃO (ACETATO DE ETILA) OBTIDOS DA ENTRECASCA DE MAYTENUS GUIANENSIS KLOTZSCH EX REISSEK (CELASTRACEAE), XIXUÁ AMAZÔNICO

AUTOR(ES): DIONATAS ULISES DE OLIVEIRA MENEGUETTI, FLÁVIO AUGUSTO DE SOUZA OLIVEIRA, RENATO ABREU LIMA, FLÁVIA APARECIDA MENEZES CARNEIRO, ELCI MARLEI FREITAG, DANIEL SOL SOL DE MEDEIROS, PATRÍCIA SOARES DE MARIA DE MEDEIROS, VALDIR ALVES FACUNDO

INSTITUIÇÃO: UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA (UNIR)

Introdução: A malária é uma das principais infecções parasitárias ocorrentes no Brasil, concentrando mais de 90% dos casos na região amazônica. Nessa região é comum a utilização de plantas medicinais como a espécie *Maytenus guianensis* para tratamento alternativo para infecções e febres, que é o principal sintoma da malária, sendo indicados estudos para comprovações das ações farmacológicas dessas espécies. **Objetivo:** O presente estudo objetivou analisar a ação antiplasmodial da fração (acetato de etila) obtido de *Maytenus guianensis*. **Métodos:** As cascas do caule de *M. guianensis* foram coletadas em fevereiro de 2008 na Reserva Florestal Adolpho Ducke localizada no Km 26 da Estrada Manaus-Itacoatiara (AM-010), a identificação da espécie foi realizada no Herbário do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA), exsicata nº 188.485. As cascas do caule foram secadas em estufa (TE-394/2, Tecnal) com ventilação forçada a 50°C por 48 horas. O extrato bruto foi obtido por maceração com etanol em temperatura ambiente, o mesmo foi fracionado em cromatografia em coluna com sílica gel, por meio de eluição com hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol. A fração utilizada para o estudo foi a obtida com acetato de etila, devido a sua boa solubilidade, e esta foi submetidos em testes de atividade *in vitro* contra *Plasmodium falciparum* cepa W2. **Resultados:** A fração (acetato de etila) apresentou um IC50 com média = 56,57 µg/ml (desvio padrão de 21,55) e R² de 0,99 (P<0,01). Apesar do IC50 da fração estudada ser maior que o da droga utilizada como controle IQG = 3,51 µg/ml, R² de 0,99 (P<0,01), os resultados são animadores, visto que a cepa W2 é resistente a cloroquina, e que da fração em estudo podem ser isolados compostos com ação antiplasmodial em concentrações ainda menores. **Conclusão:** Constatou-se que a fração (acetato de etila) de *Maytenus guianensis* apresenta ação contra cepa W2 de *P. falciparum*.

Palavras-chave: Atividade antiplasmodial, *Plasmodium falciparum* e *Maytenus guianensis*.

Órgão de financiamento: CAPES

ANEXO VIII

Resumos Publicados no 66º Encontro da Sociedade Brasileira Para o Progresso da Ciência
(SBPC)

C. Ciências Biológicas - 11. Morfologia, Citologia ou Histologia - 1. Morfologia, Citologia ou Histologia**ANÁLISE DA MUTAGENICIDADE DO EXTRATO AQUOSO DE *Maytenus guyanensis* KLOTZSCH EX REISSEK (CELASTRACEAE), XIXUÁ AMAZÔNICO**

Dionatas Ulises de Oliveira Meneguetti - Doutorando Programa de Pós Graduação em Biologia Experimental (PPGBioExp) Fundação Universidade Federal de Rondônia (UNIR); Docente Universidade Federal do Acre (UFAC);

Jaqueline Barbosa da Silva - Faculdades Integradas Aparício Carvalho (Fimca);

Renato Abreu Lima - Doutorando Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal (Rede Bionorte);

Andrina Guimarães Silva Braga - Doutoranda Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal (Rede Bionorte);

Valdir Alves Facundo - Orientador PPGBioExp e Rede Bionorte

INTRODUÇÃO:

O uso de plantas medicinais na medicina tradicional tem sido amplamente documentado na maioria dos países em desenvolvimento, a fim de ajudar a satisfazer algumas de suas necessidades de cuidados primários de saúde. A família Celastraceae contém 98 gêneros e aproximadamente 1.264 espécies, encontradas principalmente nas regiões tropicais. Os principais constituintes químicos isolados são os triterpenos pentacíclicos friedelânicos e quinoídicos, os sesquiterpenos, os secofriedelanos, os esteroides, os derivados agarofurânicos, os glicosídeos, as proantocianidinas, os flavonoides glicosilados, os alcaloides piridínicos sesquiterpênicos e as catequinas. Dentre as espécies utilizadas na medicina tradicional a *Maytenus guianensis*, popularmente conhecida como “xixua”, é uma árvore muito difundida na floresta Amazônica, e as espécies deste gênero são ricas em triterpenos da classe dos friedelanos, muitos dos quais com diversas atividades biológicas, porém poucos são os estudos sobre seus efeitos mutagênicos, o que justifica a realização do presente estudo.

OBJETIVO DO TRABALHO:

Analisar a mutagenicidade do extrato aquoso de *Maytenus guyanensis*, por meio do teste de micronúcleo em *Allium cepa*.

MÉTODOS:

As cascas do caule de *M. guianensis* foram coletadas na Reserva Florestal Adolpho Ducke Localizada no Km 26 da Estrada Manaus-Itacoatiara (AM-010), a identificação da espécie foi realizada no Herbário do (INPA), exsicata nº 188.485. As cascas do caule foram secas em estufa com ventilação a 50°C por 48 horas, em seguida raspadas para retirada da entrecasca, que foi utilizada para preparação de extrato aquoso por maceração durante 72 horas nas concentrações de (3,85), (38,5) (77) e (192) gramas por litro (g/L), além do controle negativo (CN) contendo água mineral. Os bulbos de *A. cepa* foram postos a germinar com a parte inferior em solução contendo 50 mL do extrato vegetal, por um período de 48 horas em temperatura de 24°C, sendo 10 repetições para cada tratamento. Os meristemas foram coletados quando atingiram comprimento de 0,5 a 3,0 cm, sendo realizada hidrólise dos mesmos em uma solução de HCl 1 N por 10 minutos em banho-maria a uma temperatura de 60°C, e posterior lavagem em água destilada. Em seguida realizaram-se os esfregaços em duas lâminas para cada repetição. Após secas, as lâminas foram coradas com parótic rápido. As lâminas foram analisadas em microscopia óptica, com aumento de 400x. Os micronúcleos foram observados a cada 1000 células por lâmina.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Para os tratamentos contendo CN, 3,85g/L, 38,5g/L, 77g/L e 192g/L do extrato, obteve-se respectivamente (1,2), (1,5), (0,5), (1,2) e (6,45) micronúcleos por 1000 células. A concentração 192g/L demonstrou uma alta significância estatística ($P < 0,001$), isso não é preocupante, pois essa concentração é considerada alta. Os resultados demonstram que *M. guianensis* é uma planta considerada segura em relação aos seus efeitos mutagênicos, porém testes futuros em organismos animais são indicados para melhor compreensão dos resultados.

CONCLUSÕES:

Constatou-se que o extrato aquoso da entrecasca de *M. guianensis* nas concentrações de 3,85g/L, 38,5g/L, 77g/L não provoca mutagenicidade em células eucarióticas vegetais.

Palavras-chave: Xixuá amazônico, *Maytenus guianensis*, Micronúcleo.

C. Ciências Biológicas - 11. Morfologia, Citologia ou Histologia - 1. Morfologia, Citologia ou Histologia**AValiaÇÃO DA TOXICIDADE DO EXTRATO AQUOSO DE *Maytenus guyanensis* KLOTZSCH EX REISSEK (CELASTRACEAE), XIXUÁ AMAZÔNICO**

Dionatas Ulises de Oliveira Meneguetti - Doutorando Programa de Pós Graduação em Biologia Experimental (PPGBioExp) Fundação Universidade Federal de Rondônia (UNIR); Docente Universidade Federal do Acre (UFAC);

Jaqueline Barbosa da Silva - Faculdades Integradas Aparício Carvalho (Fimca);

Renato Abreu Lima - Doutorando Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal (Rede Bionorte);

Andrina Guimarães Silva Braga - Doutoranda Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal (Rede Bionorte);

Valdir Alves Facundo - Orientador PPGBioExp e Rede Bionorte

INTRODUÇÃO:

O Brasil possui uma das mais ricas floras do mundo, estima-se que há mais de 56 mil espécies de plantas superiores. As plantas são fontes importantes de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais se constituem em modelos para síntese de um grande número de fármacos. A família Celastraceae possui distribuição tropical e subtropical com cerca de 98 gêneros e com aproximadamente 1.264 espécies. No Brasil, foram registrados quatro gêneros: *Maytenus* Juss, *Austroplenckia* Lund, *Gouppia* Reissek e *Fraunhoferia* Mar. O gênero *Maytenus* é o maior da família Celastraceae este compreende cerca de 225 espécies. *Maytenus guyanensis* é uma árvore endêmica de terra firme na Amazônia, e conhecida como chichuá, xixuá, chuchahuasi, chucchu huashu, chuchuasi e chuchasha. Suas raízes e caule são utilizados como analgésico, anti-inflamatório, afrodisíaco, relaxante muscular, antireumático e antidiarreico, sendo também indicada no tratamento de artrite, impotência, resfriado, bronquite e hemorroidas. Devido a grande utilização dessa planta pelas populações tradicionais, é indispensável a realização de estudos toxicológicos para a prevenção de intoxicações.

OBJETIVO DO TRABALHO:

Avaliação da toxicidade do extrato aquoso de *Maytenus guyanensis*, por meio do teste de micronúcleo em *Allium cepa*.

MÉTODOS:

As cascas do caule de *M. guianensis* foram coletadas em fevereiro de 2008 na Reserva Florestal Adolpho Ducke Localizada no Km 26 da Estrada Manaus-Itacoatiara (AM-010), a identificação da espécie foi realizada no Herbario do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA), exsicata nº 188.485. As cascas do caule foram secas em estufa (TE-394/2, Tecnal) com ventilação forçada a 50° C por 48 horas, em seguida raspadas para retirada da entrecasca, que foi utilizada para preparação de extrato aquoso por maceração durante 72 horas nas concentrações de (3,85), (38,5) (77) e (192) gramas por litro (g/L), além do controle negativo (CN) contendo água mineral e controle positivo (CP), contendo 800mg/L de paracetamol. A análise toxicológica em *A. cepa* é realizada com base na germinação dos meristemas. As raízes foram medidas com 48 horas de germinação. A cada espécie de *A. cepa* foram medidas as três maiores raízes, totalizando 30 raízes por tratamento. Para a avaliação estatística utilizou-se a Análise de Variância (ANOVA) e o teste Tukey, com auxílio do software Graphad Prism 5.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

No teste de toxicidade a média do crescimento dos meristemas foram CN (0,97cm), 3,85g/L (1,63cm), 38,5g/L (0,93cm), 77g/L (0,46cm) e 192g/L (0,18cm). As concentrações de 77g/l e 192g/L obtiveram significância estatística em relação ao controle negativo com ($P < 0,001$), demonstrando uma ação tóxica. Outro resultado que merece destaque foi a concentração de 3,85g/L que também apresentou uma significância de ($P < 0,001$), porém não inibindo o crescimento dos meristemas e sim estimulando o seu crescimento. Já no teste de antitoxicidade a média do crescimento dos meristemas foram CP (0,16cm), 3,85g/L (1,40cm), 38,5g/L (0,80cm), 77g/L (0,43cm) e 192g/L (0,17cm). Os melhores resultados foram 3,85 g/L e 38,5 g/L, ambas com ($P < 0,001$) em reação ao controle positivo, seguido da concentração de 77 g/L com ($p < 0,05$), essa última que apresentou tanto ação tóxica e antitóxica em relação aos controles.

CONCLUSÕES:

Constatou-se que extrato aquoso de *M. guianensis* nas concentrações de 3,85g/L e 38,5g/L não apresentam ação tóxica, e essas mesmas concentrações demonstraram ação antitóxica inibindo os efeitos ocasionados por 800mg/L de paracetamol.

Palavras-chave: *Maytenus guyanensis*, Xixuá amazônico, *Allium cepa*.

ANEXO IX

Resumo Publicado no XI Congresso Latinoamericano de Botânica



ANÁLISE FITOQUÍMICA DA ENTRECASCA DE *Maytenus guyanensis* KLOTZSCH EX REISSEK

Renato Abreu Lima^{1,3}, Andrina Guimarães Silva Braga^{1,3}, Dionatas Ulises de Oliveira Meneguetti², Fernanda Bay-Hurtado³ & Valdir Alves Facundo³

¹Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal, Manaus, Amazonas, Brasil; ²Programa de Pós-Graduação em Biologia Experimental, Porto Velho, Rondônia, Brasil; ³Laboratório de Pesquisa em Química de Produtos Naturais, Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, Rondônia, Brasil. renatoabreu07@hotmail.com

A Floresta Amazônica Brasileira, até pela sua riqueza e diversidade biológica, pode oferecer a oportunidade para descobertas de inovadoras e eficientes moléculas com potencial de uso, em larga escala. O interesse em metabólitos secundários tem crescido muito nos últimos anos, devido à sua ampla utilização como matéria prima na preparação de substâncias com atividade biológica. Especificamente em relação às plantas Amazônicas produtoras de óleos essenciais e extratos vegetais, a *Maytenus guyanensis* Klotzsch Ex Reissek é uma árvore endêmica de nossa região, e é conhecida popularmente como chichuá. Suas raízes e caule são utilizados como analgésico, anti-inflamatório, afrodisíaco, relaxante muscular, antireumático e antidiarreico, sendo também indicada no tratamento de artrite, impotência, resfriado, bronquite e hemorroidas. Com isso, este trabalho teve como objetivo realizar uma análise fitoquímica da entrecasca de *M. guyanensis*. A elaboração dos extratos das cascas e cerne de *M. guyanensis* foi realizada por percolação com etanol a temperatura ambiente. Os fracionamentos destes extratos foram feitos com hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol. A concentração dos extratos e frações foi realizada em rotaevaporador sob pressão reduzida. O isolamento dos compostos químicos foi realizado por meio de cromatografia em coluna de sílica gel e cromatografia em camada delgada e sendo utilizados como eluentes, hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol, puros ou polaridade crescente. A determinação estrutural dos compostos isolados foi realizada por análises de espectroscopias de Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio (RMN ¹H) e de carbono-13 (RMN ¹³C), espectroscopia na região do infravermelho (I.V.) e espectroscopia de massa (E.M). Da entrecasca de *M. guyanensis* foram isolados cinco substâncias de caráter terpenoides: (29-hidroxi-friedelan-3-ona), (16-hidroxi-friedelan-3-ona), (3-hidroxi-friedelano), (Tingenona), (Tingenina B). Acredita-se que esses compostos possam apresentar boas atividades biológicas, tanto na área da agropecuária contra fungos e bactérias patogênicas, como na área médica contra principalmente protozoários, ambos que são alvos para estudos futuros com esses compostos. Constatou-se que a entrecasca de *M. guyanensis* apresenta cinco compostos de caráter terpenoides, sendo indicados estudos futuros para a caracterização dos compostos presentes para caracterização fitoquímica completa dessa espécie. (FAPEAM, CAPES)

Palavras-chave: Celastraceae, xixuá amazônico, Análise fitoquímica.

ANEXO X
Resumos Publicados no VII Simpósio Iberoamericano de Plantas Mediciniais

VII Simpósio Iberoamericano de
Plantas Medicinais



II Simpósio Iberoamericano de
Investigação em Câncer

A biodiversidade Iberoamericana como fonte de produtos naturais bioativos
Ilhéus-BA 27 à 30 de outubro de 2014

ANÁLISE CITOTÓXICA E ANTICITOTÓXICA DO EXTRATO AQUOSO DA ENTRESCASCA DE *Maytenus guianensis* KLOTZSCH EX REISSEK (CELASTRACEAE)

Dionatas Ulises de Oliveira Meneguetti¹, **Renato Abreu Lima**², Andrina Guimarães Silva Braga², Fernanda Bay-Hurtado³, Valdir Alves Facundo^{1,2,3}

1. Docente Fundação Universidade Federal do Acre (UFAC), Programa de Pós Graduação em Biologia Experimental (PPGBioExp) da Fundação Universidade Federal de Rondônia (UNIR);
2. Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal (Rede BIONORTE);
3. Departamento de Química (UNIR).

Introdução: A Floresta Amazônica até pela sua riqueza e diversidade biológica, pode oferecer a oportunidade para descobertas de novas moléculas com potencial de uso. *Maytenus guianensis* é conhecida popularmente como chichuá. Suas raízes e caule são utilizados como analgésico, antiinflamatório, relaxante muscular, artrite e bronquite.

Objetivo: O presente estudo objetivou analisar a ação citotóxica e anticitotóxica do extrato aquoso de *M. guianensis*. **Método:** As cascas do caule de *M. guianensis* foram secas em estufa com ventilação forçada a 50° C por 48 horas, em seguida raspadas para retirada da entrecasca, que foi utilizada para preparação de extrato aquoso por maceração durante 72 horas nas concentrações de 3,85; 38,5; 77 e 192 g/L, além do controle negativo (CN) contendo água mineral e controle positivo (CP), contendo 800mg/L de paracetamol. Os bulbos de *A. cepa* foram postos a germinar com a parte inferior mergulhada em solução contendo 50 mL do extrato vegetal, por um período de 48 horas em temperatura de 24°C, sendo 10 repetições para cada tratamento. Os meristemas foram coletados quando atingiram comprimento de 0,5 a 3,0 cm, sendo realizada hidrólise dos mesmos em uma solução de HCl 1 N por 10 minutos em banho-maria a uma temperatura de 60°C, e posterior lavagem em água destilada. Em seguida, realizaram-se os esfregaços em duas lâminas para cada repetição e coradas com parótico rápido. As lâminas foram analisadas em microscopia óptica, com aumento de 400X, em cada lâmina foram contadas mil células e quantificado o Índice Mitótico (IM). **Resultados:** Os resultados demonstram que o tratamento de 3,85mg/mL aumentou a divisão celular de maneira significativa IM:49,11 (P<0,001), diferentemente das concentrações de 77mg/mL IM:9,13 (P<0,05) e 192mg/mL IM:5,57 (P<0,001), que demonstraram ação antiproliferativa do Índice Mitótico. Os tratamentos de 3,85mg/mL IM:44,50 (P<0,001), 38,5 mg/mL IM:10,33 (P<0,001) e 77mg/mL IM:8,22 (P<0,05) apresentaram ação inibitória dos efeitos ocasionados pelo CP. **Conclusão:** Constatou-se que o extrato aquoso da entrecasca *M. guianensis* nas concentrações de 3,85 e 38,5 mg/mL não apresenta ação citotóxica, e ainda atuam como anticitotóxico, porém novas concentrações precisam ser testadas para um melhor entendimento dos efeitos da utilização desses extratos vegetais a longo prazo.

Palavras-chave: Xixuá amazônico; Mitose; Interfase.

Agência Financiadora: Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPFAM).



AValiação DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA SOBRECASCA DE *Maytenus guianensis* KLOTZSCH EX REISSEK (CELASTRACEAE)

Cássia Cristina Marangoni de Viveiros¹; Renato Abreu Lima^{2,3}; Fernanda Bay-Hurtado³; Dionatas Ulises de Oliveira Meneguetti³; Andrina Guimarães Silva Braga^{2,3}; Valdir Alves Facundo^{2,3}

1. Graduanda em Ciências Biológicas pela Faculdade São Lucas – FSL, Porto Velho/RO; cassiaviveiros@gmail.com
2. Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia pela Universidade Federal do Amazonas, Rede BIONORTE – UFAM, Manaus/AM;
3. Laboratório de Pesquisa em Química de Produtos Naturais – Porto Velho/RO.

Introdução: As raízes e caule de *Maytenus guianensis* são utilizados como analgésico, anti-inflamatório, afrodisíaco, relaxante muscular, antireumático e antidiarreico. Como cosmético é utilizado nas erupções cutâneas e prevenção de câncer de pele. **Objetivos:** Investigar as atividades antioxidantes (AA) através da captura do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) do extrato etanólico da sobrecasca (ETOHMG) do caule de *M. guianensis* e seus eluatos hexânico (EHMG), clorofórmico (ECIMG) e acetônico (EAcMG).

Métodos: Para a avaliação da AA foi preparada uma solução de 100 microgramas/mL de DPPH em metanol, as soluções teste de *M. guianensis* foram preparadas em metanol, para o ETOHMG, EHMG, ECLMG e EAcMG, nas concentrações de 10, 50, 100, 150 e 250 microgramas/mL e para a solução padrão de *Ginkgo biloba*. Em seguida em 2,5 mL das soluções das amostras foram adicionados 1 mL da solução de DPPH e mantidas ao abrigo de luz. Como branco foi utilizado 1 mL da solução de DPPH e 2,5 mL de metanol. Vinte minutos após a adição de DPPH às amostras e ao branco, foram realizadas as leituras em espectrofotômetro de Ultravioleta UV-Vis (Shimadzu UV 1601) em 517 nanômetros. Os testes foram realizados em triplicata, e com a média dos dados calculou-se a porcentagem da atividade antioxidante (% AA) e a concentração efetiva 50% (CE₅₀) foi determinada através da regressão linear dos valores.

Resultados: Os resultados evidenciaram a AA da sobrecasca de *M. guianensis*, havendo diferença significativa positiva (teste de Tukey) nas concentrações de 200 microgramas/mL nos EHMG (94,91 %) e ECIMG (96,11 %), concentração de 150 microgramas/mL no ETOHMG (95,93 %) e EHMG (95,59 %), ECIMG (94,53 %) e EAcMG (94,70 %), quando comparados com o padrão comercial *G. biloba* (Egb 761). Para a CE₅₀ os resultados obtidos com o ETOHMG (50,44 microgramas/mL) e EAcMG (49,52 microgramas/mL) foram os que mais se aproximam do valor obtido com o extrato de *G. biloba* (Egb 761) (46,62 microgramas/mL). **Conclusões:** O extrato etanólico da sobrecasca e do caule foram encontrada atividade antioxidante sendo que o eluato acetônico se mostrou com melhor capacidade com relação aos demais, porém inferior ao padrão de *G. biloba*.

Palavras-chave: Fitoquímica; Xixuá; Amazônia.

Agência Financiadora: Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).