



ARTIGO

Atividade antiplasmodial e citotóxica *in vitro* da entrecasca do caule de *Maytenus guianensis* Klotzsch Ex Reissek

Fernanda Bay-Hurtado^{1*}, Daniel Sol Sol de Medeiros², Renato Abreu Lima³, Márcia Bay⁴, Elci Marlei Freitas⁵, Valdir Alves Facundo⁶ e Patrícia Soares Maria de Medeiros⁷

Recebido: 18 de agosto de 2015 Recebido após revisão: 18 de janeiro de 2016 Aceito: 25 de janeiro de 2016
Disponível on-line em <http://www.ufrgs.br/scerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/3493>

RESUMO: (Atividade antiplasmodial e citotóxica *in vitro* da entrecasca do caule de *Maytenus guianensis* Klotzsch Ex Reissek). Espécies pertencentes ao gênero *Maytenus* (Celastraceae) são utilizadas na medicina tradicional na região Amazônica contra câncer, como anti-inflamatório. *M. guianensis*, popularmente conhecida como “chichuá e xixuá” é uma árvore muito difundida na floresta Amazônica. No presente estudo o extrato acetônico da entrecasca do caule desta espécie foi investigada acerca de sua atividade citotóxica nas células HepG2 e antiplasmodial no *Plasmodium falciparum* cepa 3D7. A citotoxicidade foi determinada através do método colorimétrico do (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio) e o teste anti-*P. falciparum* através do ensaio imunoenzimático anti-HRP. Para o teste de atividade citotóxica nenhuma amostra testada apresentou citotoxicidade de acordo com o *National Institute of Cancer*. No teste anti-*P. falciparum* os resultados foram promissores e expressos em termos de IC₅₀ (ng.mL⁻¹), respectivamente: extrato acetônico da entrecasca do caule com 253,02 ± 0,56, fração hexânica com 292,23 ± 0,83, fração clorofórmica com 292,76 ± 0,01, fração acetônica com 188,37, friedelinol com 837,04 ± 0,05 e 16 β-hidroxifriedelina com 950,25 ± 0,46. Os resultados obtidos contribuíram para o estudo quimiotaxonômico da família Celastraceae e mostrou que *M. guianensis* pode vir a ser uma fonte alternativa de compostos que poderão ser protótipos de drogas que atuarão frente à malária. **Palavras-chave:** Celastraceae, triterpenos friedelanos, *Plasmodium falciparum*, citotoxicidade.

ABSTRACT: (*In vitro* antiplasmodial and cytotoxic activity of the stem inner bark of *Maytenus guianensis* Klotzsch Ex Reissek). Species of the *Maytenus* genus (Celastraceae) are commonly used in folk medicine in the Amazon region against cancer and as an anti-inflammatory agent. *Maytenus guianensis*, popularly known as “chichuá” or “xixuá”, is a widespread tree in the Amazon rainforest. In this study, we investigated the acetone extract of the inner bark of this species regarding its cytotoxic activity against HepG2 cells and its antiplasmodial activity against the 3D7 strain of *Plasmodium falciparum*. Cytotoxicity was determined by the colorimetric method (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) and the anti-*P. falciparum* activity was tested using anti-HRP antibodies in an enzyme-linked immunosorbent assay. In the cytotoxicity assay, no cytotoxic activity was detected in any tested sample, according to the National Institute of Cancer standards. The results of the anti-*P. falciparum* test, on the other hand, were promising (values expressed as IC₅₀, in ng.mL⁻¹): 253.02 ± 0.56 for the acetone extract of the inner bark, 292.23 ± 0.83 for the hexane fraction, 292.76 ± 0.51 for the chloroform fraction, 188.37 ± 0.74 for the acetone fraction, 837.04 ± 0.23 for friedelinol, and 950.25 ± 0.46 for 16 β-hydroxyfriedelin. Our results contributed with the chemotaxonomy of the Celastraceae and showed that *M. guianensis* may be an alternative source of compounds that could be used in prototypes of anti-malaria drugs.

Keywords: Celastraceae, friedelane triterpenes, *Plasmodium falciparum*, cytotoxicity.

INTRODUÇÃO

A malária é uma infecção parasitária que permanece associada à elevada morbidade, à considerável mortalidade e ao impacto econômico significativo nos países afetados. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a malária ocorre em mais de 100 países e territórios, sendo que os parasitas estão presentes em todas as áreas tropicais e a doença é endêmica em toda a África sub-sahariana, sudeste da Ásia, Indonésia e ilhas da Oceania com exceção da Nova Zelândia, e nas Américas Central e

do Sul (OMS 2013). Estima-se que cerca de 3,2 bilhões de pessoas (40% da população mundial) vivem em áreas de risco para a doença, sendo que em 2012 estima-se que houve 207 milhões de casos registrados de pessoas infectadas por malária, dentre estes 627 mil culminaram em mortes e destas, principalmente crianças menores de 5 anos de idade e mulheres grávidas (OMS 2013).

Das cinco espécies do gênero capazes de transmitir a malária humana: *P. falciparum* (Welch, 1897), *P. vivax* (Grassi & Feletti 1890), *P. malariae* (Laveran, 1881), *P. ovale* (Stephens, 1922) e *P. knowlesi* (Franchiti, 1927), o

1. Laboratório de Pesquisa em Química de Produtos Naturais (LPQPN), Universidade Federal do Rondônia (UNIR). Porto Velho, RO, Brasil.
 2. Departamento de Biologia (DEBio). Porto Velho, Rondônia, Brasil.
 3. Programa de Pós-Graduação em Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal (BIONORTE), Universidade Federal do Rondônia (UNIR). Porto Velho, RO, Brasil.
 4. Instituto Federal de Educação Ciências e Tecnologia de Rondônia (IFRO). Porto Velho, RO, Brasil.
 5. Laboratório de Quimioterapia da Malária (LQM) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ- Rondônia). Porto Velho, RO, Brasil.
 6. Laboratório de Pesquisa em Química de Produtos Naturais (LPQPN), Universidade Federal do Rondônia (UNIR). Porto Velho, RO, Brasil.
 7. Departamento de Biologia (DEBio), Universidade Federal do Rondônia (UNIR), Laboratório de Quimioterapia da Malária (LQM) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ- Rondônia). Porto Velho, RO, Brasil.
- * Autor para contato. E-mail: fernandabay@unir.br

P. falciparum é o responsável pelas formas mais graves da doença (Cox-Singh *et al.* 2008, Cumbane 2011).

Nas Américas, a doença ocorre em 21 países e territórios, sendo que 20% da população total vivem em locais de risco. Os relatos de casos na região diminuíram de 1,18 milhões em 2000 a 526.000 em 2009, sendo que quatro países representam 90% dos casos reportados em 2009 (Brasil, Colômbia, Haiti e Peru) (OMS 2013). Segundo o Ministério da Saúde, mais de 60% do Território Brasileiro possui condições propícias à transmissão natural da malária, que pode ocorrer por meio da picada de fêmeas de mosquitos do gênero *Anopheles*, sendo mais importante a espécie *A. darlingi*, cujos criadouros preferenciais são coleções de água limpa, quente, sombreada e de baixo fluxo (Brasil 2009).

A grande complexidade do ciclo de vida do *Plasmodium* explica as enormes dificuldades que têm surgido para o estabelecimento de uma terapia antimalárica eficaz e segura. Por atuarem em diferentes fases do ciclo do parasita, os antimaláricos podem ser classificados como esquizotomicidas, hipnozoitomicidas, gametocitocidas ou esporonticidas (Nunes & Ferreira 2005).

Os fármacos utilizados na quimioterapia da malária englobam um grande número de moléculas orgânicas, que são tradicionalmente distribuídas em três grupos: amino-álcoois, que incluem os alcaloides do grupo das quinolinas, dos quais a quinina é o exemplo clássico, e todas as aminoquinolinas sintéticas; derivados artemisinínicos, grupo constituído pelo sesquiterpeno artemisinina e seus derivados; antifolatos e outros, no qual se encontram antibióticos com atividade antimalárica, como biguanidas e sulfonamidas, e outros que não se encaixam nas duas famílias anteriores (Rang *et al.* 2012).

O gênero *Maytenus* é o maior e mais diversificado da família Celastraceae e está inserido na subfamília Celastroideae, seção Oxphylla, que é restrita a América do Sul (Carvalho-Okano & Leitão-Filho 2004), ainda de acordo com os referidos autores, o gênero *Maytenus* é considerado pantropical e cerca de 40% das espécies ocorrem no Brasil, incluindo representantes arbóreos, arbustivos e subarbustivos, com porte variando entre 1,5-8,0 m e árvores de até 20 m. Seus ramos são geralmente eretos, simples ou bastante ramificados na porção apical com entrenós expostos na maioria das espécies, podem ser cilíndricos, achatados, retangulares ou carenados com suas superfícies variando entre glabra a pilosa e sem espinhos (Pessuto 2006).

M. guianensis é uma árvore endêmica de terra firme, encontrada na floresta Amazônica, principalmente no Peru, Equador e Colômbia, é conhecida como chichuá, xixuá, chuchahuasi, chuchhu huashu, chuchhuasi e chuchasha (Borrás 2003; Ducke & Vasquez 1994; Revilla 2002). O pó vermelho da casca de sua raiz é utilizado na forma de infusão como tônico, tratamento de reumatismo, contraceptivo e afrodisíaco (Da Silva 1990). Para o uso tópico a infusão da casca do caule é empregada como agente antitumoral em câncer de pele e, também, para o tratamento de feridas (Da Silva 1990). Suas raízes e

caule também são utilizados como analgésico, anti-inflamatório, afrodisíaco, relaxante muscular, antireumático e antidiarréico, artrite, resfriado, bronquite, hemorroidas, verminoses, úlceras externas e usos ginecológicos (Borrás 2003), como cosmético é utilizada nas erupções cutâneas e prevenção do câncer de pele (Revilla 2002).

Dentre as espécies da região Norte a espécie *M. guianensis* recebe destaque pois é utilizada na medicina popular para o tratamento de diversas enfermidades com destaque para ação antiparasitária e anticancerígena (Revilla 2002; Macari *et al.* 2006), demonstrando grande potencial etnofarmacológico a ser explorado, e devido a isso o presente estudo objetivou verificar a atividade do extrato acetônico da entrecasca do caule, seus eluatos e os metabólitos isolados (3 β - Hidroxifriedelano e 3-oxo-16 β -hidroxifriedelano) quanto a citotoxicidade *in vitro*, nas células de hepatoma humano - HepG2, e atividade antiplasmodial *in vitro* no *P. falciparum* cepa 3D7.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta do material vegetal

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) (2°53'S, 59°58'O), a identificação da espécie foi realizada no Herbário do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA), exsicata n° 188.485.

Preparação do extrato acetônico e eluatos

As referidas cascas foram secas em estufa (TE-394/2, Tecnal) com ventilação forçada a 40 °C por 48 h e em seguida raspadas para retirada da entrecasca, fornecendo 210 g, sendo 105 g desta submetida à maceração com acetona P.A. (Synth), em temperatura ambiente, por quatro semanas. Após rotaevaporação (Fisaton 801) obteve-se 48,0 g de extrato acetônico (EAMG). As frações foram preparadas a partir de 24,0 g do EAMG, que foi adsorvido em 100 g de sílica gel (Vetec ϕ μ m 63-230) e submetido à coluna filtrante, sendo eluído com hexano (Synth), clorofórmio (Synth) e acetona (Synth). Após a rotaevaporação obteve-se 6,84 g de fração hexânica (FHMG), 4,25 g de fração clorofórmica (FCIMG) e 8,75 g de fração acetônica (FACMG).

Isolamento e purificação dos metabólitos secundários

A FHMG (5,0 g) foi submetida ao processo de cromatografia em coluna (CC), utilizando-se sílica gel como fase estacionária e os solventes hexano, acetato de etila, clorofórmio, metanol e acetona, puros ou em misturas com polaridade crescente, como fase móvel. Todos os solventes foram eluídos de forma ininterrupta e as frações foram coletadas de 50 mL cada, estas frações foram concentradas em rotaevaporador sob pressão reduzida até total eliminação do solvente orgânico e armazenadas em frascos de vidro individuais, tal procedimento permitiu a obtenção de um total de trinta e nove frações. O monitoramento de tais frações foi realizado através de

cromatografia em camada delgada (CCD) (cromatoplas de gel de sílica 60 com ϕ 2-25 μm sobre poliéster T-6145 Merck com indicador de fluorescência na faixa de 240 nm). Em seguida, foram reunidas utilizando-se como parâmetro comparativo seu perfil cromatográfico através de revelador universal (mistura de etanol PA (Synth): ácido acético PA (Synth): ácido sulfúrico fumegante (Synth) na proporção de 80:10:10) e aquecimento em chapa quente (100 °C, por aproximadamente 1 min), de acordo com seu perfil cromatográfico em CCD, as frações foram reagrupadas e resultaram em 12 subfrações. Das quais, as frações 5-7 foram reunidas, e a subfração resultante submetida à nova CC em sílica gel resultando em dez frações, das quais as frações 4-8 apresentaram um sólido branco denominado CQH-1. As frações 9-15 foram reunidas após comparação em CCD, e a subfração resultante apresentou um precipitado branco que foi recristalizado em éter etílico resultando em um sólido branco denominado CQH-2. As frações 20-32 após comparação em CCD foram reunidas e submetidas à nova CC em sílica gel resultando em 12 subfrações, das quais as frações 3-10 apresentaram um sólido branco denominado CQH-3. As frações 34-38 após análise em CCD foram reagrupadas e apresentaram um sólido branco que foi recristalizado em éter etílico e denominado CQH-4.

Os espectros de massas foram obtidos por meio de impacto eletrônico (70 Ev) em aparelho de GC/MS (Hewlett-Packard 5971) utilizando coluna capilar (30 m x 0,25 mm) dimetilpolisiloxano BD-1, tendo He como gás de arraste e as temperaturas de 250 °C no injetor, 200 °C no detector e na coluna variando 1 °C.min⁻¹, entre 35-180 °C, e 10 °C.min⁻¹, no intervalo de 180-250 °C.

A identificação estrutural dos constituintes químicos isolados da entrecasca do caule de *M. guianensis* foi realizada por meio de métodos espectroscópicos de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio-1 (RMN-¹H) e carbono-13 (RMN-¹³C), uni e bidimensional, Espectroscopia de Massa (EM) e espectroscopia na região do Infravermelho (IV).

Teste de citotoxicidade

A linhagem celular de hepatocarcinoma celular (HepG2) foi cultivada como recomendado por Calvo-Calle *et al.* (1994) em meio Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI) incompleto (sem soro fetal bofino –SBF- e gentamicina), incubadas em estufa com 5% de CO₂ a 37 °C (Laboven, L212), após 1 x 10⁶ células. mL⁻¹ e 180 μL foram acrescentados a cada poço da placa de cultura com 96 poços (KASVI K12-96). As células foram incubadas por 24 h em estufa com 5 % de CO₂ e 37 °C para adesão aos poços da microplaca. Em seguida, 20 μL de meio RPMI completo contendo diferentes concentrações seriadas (1:2) do extrato EAMG e frações FHMG, FCIMG e FAcMG (9,37 a 600 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$) e CQH-2 e CQH-3 (2,34 a 150 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$) foram adicionados aos poços da placa de cultura. As placas foram incubadas por 24 h em estufa com 5% de CO₂ e 37 °C (Laboven, L212). Para o EAMG e frações FHMG, FCIMG e FAcMG foi

preparada uma placa denominada “Branco” (submetida as mesmas condições, porém sem a cultura de células HepG2), uma vez que estes possuíam coloração laranja e interfeririam na leitura final da placa.

A citotoxicidade foi determinada através do método colorimétrico do MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio] (Madureira *et al.* 2002). Após 24 horas de cultivo das células, foi adicionado em cada poço, 20 μL de MTT a concentração de 5 mg.mL⁻¹ em PBS 1X (p/v) e as placas foram deixadas por três horas em estufa com 5% de CO₂ e 37 °C. Ao final desse período, o meio de cultura foi desprezado e, em seguida, 100 μL de DMSO (Sigma-Aldrich) foram adicionados a cada poço. A leitura óptica foi realizada em espectrofotômetro (BIO-RAD Modelo 3550) em λ de 570 nm, e a densidade óptica (DO) média dos poços, foi comparada com a DO média, dos poços controles. A DO da placa com o EAMG e frações FHMG, FCIMG e FAcMG foi subtraída da DO da placa “Branco” antes da realização dos cálculos para determinação da mínima dose letal de 50% das células de HepG2 (MDL₅₀), devido ao fato do extrato e eluatos terem coloração alaranjada. Todos os testes foram realizados em triplicata e repetidos por três vezes para confirmação dos resultados obtidos. As MDL₅₀, foram determinadas a partir de regressão linear das concentrações testadas, admitindo-se intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$) para a reta obtida, utilizando-se o programa Microcal Origin versão 8.0.

Cultivo do *P. falciparum* cepa 3D7 e sincronização dos parasitos para utilização nos testes in vitro

As cepas de *P. falciparum* 3D7 foram mantidas em cultura de suspensão de hemácias humanas com fator A+ ou O+ com hematócrito de 5%, seguindo fundamentalmente a técnica de Trager e Jansen (1976), adaptada. O acompanhamento do desenvolvimento dos parasitos foi realizado por microscopia (Microscópio CX21, Olympus). Os cultivos com predomínio de anéis utilizados nos ensaios de quimioterapia foram obtidos através de sincronização com sorbitol, conforme descrito na literatura (Lambros & Vanderberg 1979).

Preparo das placas testes para os ensaios de quimioterapia

Culturas de parasitos sincronizadas com predomínio de anéis de *P. falciparum* cepa 3D7 foram distribuídas em placas de cultura de 96 poços adicionando-se 180 μL por poço de meio de cultura RPMI contendo 0,05% de parasitemia e 1% de hematócrito para o teste de ELISA anti-HRPIL. Anteriormente a adição da suspensão dos parasitos, 20 μL dos compostos a serem testados foram adicionados o EAMG, as frações FHMG, FCIMG, FAcMG e substâncias isoladas CQH-2 e CQH-3 à placa teste, em triplicata, e em diferentes concentrações seriadas (1:2) com concentração inicial de 0,15 e final 10 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$. Os poços controles continham hemácias infectadas sem adição dos compostos-testes (controle negativo). O antimalárico padrão (cloroquina – CQ) foi

testado em paralelo em todos os experimentos realizados, em diluições seriadas (1:2), como controle positivo com concentração inicial de 1,56 e final 100 ng.mL⁻¹.

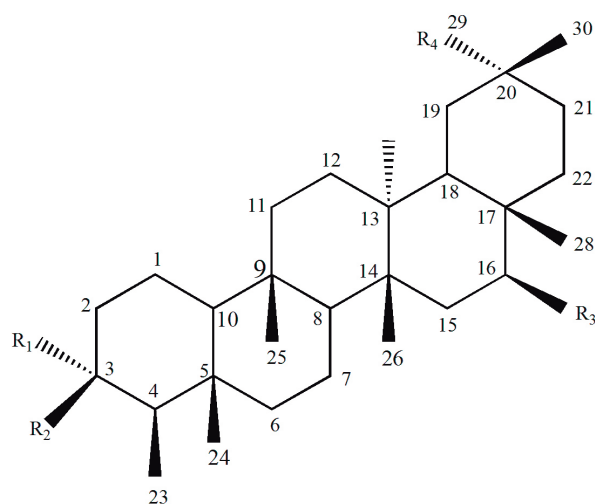
Teste imunoenzimático anti-HRP II

No ensaio imunoenzimático anti-HRP II (Noedl *et al.* 2002), além da placa teste descrita acima, outra placa de 96 poços foi pré-sensibilizada com o anticorpo monoclonal primário anti-HRP II (MPFM-55A ICLLAB®, EUA). Após 72 h totais de incubação, as placas foram congeladas e descongeladas duas vezes à - 20 °C para provocar a lise das hemácias. A cada poço da placa foram adicionados 100 µL das amostras da cultura de *P. falciparum* hemolisadas. Em seis poços da placa foram adicionados 100 µL dos controles congelados nas primeiras 24h (*background*). Após o período de incubação junto ao anticorpo secundário (MPFG55P ICLLAB®, EUA), o teste foi revelado em solução de 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB) acrescentados a cada poço. A leitura das absorbâncias foi realizada em λ de 450 nm em espectrofotômetro. A determinação da concentração inibitória de 50 % dos parasitos (IC₅₀) foi realizada a partir de regressão não linear, relacionando-se o percentual de inibição em função do logaritmo das concentrações testadas admitindo-se um intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$), para a reta obtida utilizando-se o programa Microcal Origin versão 8.0. O índice de seletividade (IS) das amostras testadas foi obtido calculando-se a razão entre o valor da MDL₅₀ e o valor da IC₅₀. Valores maiores que 10 foram considerados indicativos de ausência de toxicidade, enquanto substâncias com valores abaixo de 10 foram consideradas tóxicas (Bézivin *et al.* 2003).

RESULTADOS

As substâncias isoladas (Fig. 1) no presente estudo já foram descritas para a espécie *M. guianensis* por Facundo *et al.* (2015), onde as composições dos compostos 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: friedelina –CQH-1- (Fig. 1a), friedelinol –CQH-2- (Fig. 1b) (Almeida *et al.* 2011), 16 β-hidroxifriedelina –CQH-3- (Fig. 1c) (Duarte *et al.* 2009), 29-hidroxifriedelina –CQH-4- (Fig. 1d) (Betacor *et al.* 1980). Dentre estes metabólitos secundários, os testes de citotoxicidade e atividade antiplasmodial foram realizados apenas com dois: o friedelinol (CQH-2) e 16 β-friedelina (CQH-3), devido à baixa solubilidade dos demais.

Os resultados obtidos para os testes de viabilidade celular (citotoxicidade) na linhagem celular HepG2 e atividade antiplasmodial contra o *P. falciparum* linhagem 3D7 (sensível à cloroquina) estão indicados nas Tabela 1. No teste de citotoxicidade, o que apresentou maior valor foi a FHMg e dos metabólitos secundários isolados a CQH-3, e para o teste anti-*P. falciparum* o resultado mais expressivo para as frações foi para a FAcMG e para os metabólitos secundários isolados para a CQH-2, porém o IS aponta que o resultado mais promissor é para a CQH-



- R₁=R₂=O; R₃=H; R₄=CH₃ (a)
 R₁=R₃=H; R₂=OH; R₄=CH₃ (b)
 R₁=R₂=O; R₃=OH; R₄=CH₃ (c)
 R₁=R₂=O; R₃=H; R₄=CH₂OH (d)

Figura 1. Estrutura dos triterpenos friedelina (a), friedelinol (b), 16 β-hidroxifriedelina (c) e 19 – hidroxifriedelina (d).

3 com IS = 38,46, sendo este resultado inferior ao da cloroquina, o fármaco padrão utilizado atualmente neste tipo de ensaio e também para o tratamento da malária.

DISCUSSÃO

Buscando novos antimaláricos de baixo custo, alta eficiência e baixa toxicidade, pesquisou-se a ação do EAMG, das frações FHMg, FCIMg, FAcMG e substâncias isoladas CQH-2 e CQH-3 de *M. guianensis*, planta usada popularmente para tratar infecções e inflamações em geral. De acordo com o levantamento bibliográfico realizado para a execução deste trabalho, este é o primeiro estudo desta espécie em ensaios de atividade anti-*P. falciparum*, porém diversas plantas pertencentes a este gênero vêm mostrando atividade antiplasmodial (Clarkson *et al.* 2004, Muthaura *et al.* 2007, Oliveira 2007, Malebo *et al.* 2009). A presença desses terpenoides pode justificar

Tabela 1. Valores de citotoxicidade nas células HepG2, IC₅₀ para o *P. falciparum* cepa 3D7 e seus respectivos índices de seletividade (IS).

Amostras	HepG2	<i>P. falciparum</i>	Índice de Seletividade (IS)
	MDL ₅₀	cepa 3D7	
	(mg.mL ⁻¹)	IC ₅₀ (ng.mL ⁻¹)	
	(média ± DP)	(média ± DP)	
EAMG	101,23 ± 0,49	253,02 ± 0,56	399,17
FHMg	31,69 ± 0,72	292,23 ± 0,83	108,44
FCIMg	93,13 ± 0,74	292,76 ± 0,51	318,11
FAcMG	144,42 ± 0,42	188,37 ± 0,74	766,68
CQH-2	35,26 ± 0,32	837,04 ± 0,23	42,12
CQH-3	40,16 ± 0,23	950,25 ± 0,46	42,26
CQ	0,49 ± 0,03	11,61 ± 0,12	42,57

Abreviaturas: MDL₅₀, mínima dose letal de 50 % das células de HepG2; IC₅₀, Concentração Inibitória de 50 % dos parasitos; IS, MDL₅₀ / IC₅₀

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, Dos Santos *et al.* 2013, Begum *et al.* 2014, Toledo *et al.* 2014, Silva *et al.* 2014, Bernal & Coy-Barrera 2014).

Dentre as amostras testadas (EAMG, FHMg, FCIMg, FAcMG, CQH-2 e CQH-3), nenhuma apresentou atividade citotóxica considerável, pois segundo o protocolo do *National Cancer Institute* (NCI), valores de $MDL_{50} \leq 30 \mu\text{g.mL}^{-1}$ devem ser considerados significativos para extratos brutos de origem vegetal, assim como os valores de $MDL_{50} \leq 4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ devem ser considerados significativos para substâncias puras (Suffness & Pezzuto 1990). Sendo os mais citotóxicos o FHMg com MDL_{50} de $31,69 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e o menos citotóxico o FAcMG com MDL_{50} de $144,42 \mu\text{g.mL}^{-1}$, para os metabólitos secundários isolados o mais citotóxico foi o CQH-2 com MDL_{50} de $35,26 \mu\text{g.mL}^{-1}$, estes resultados demonstraram ser possível continuar com os testes de atividade anti-*P. falciparum*.

Os resultados obtidos nos ensaios anti-*P. falciparum* cepa 3D7 apresentaram atividade relevante nos ensaios de HRPII (Tab. 1), sendo o resultado mais ativo para o EAMG com IC_{50} de $188,37 \text{ ng.mL}^{-1}$ e o menos ativo para o FCIMg com IC_{50} de $292,76 \text{ ng.mL}^{-1}$, para os metabólitos secundários isolados testados o CQH-2 apresentou IC_{50} de $837,04 \text{ ng.mL}^{-1}$ e CQH-3 um IC_{50} de $950,25 \text{ ng.mL}^{-1}$.

Para finalizar, foi calculado o índice de seletividade (IS) a partir da razão entre MDL_{50} das células HepG2 e os resultados da atividade anti-*P. falciparum* (IC_{50}). Essa análise mostrou que todos os compostos são seguros uma vez que a relação entre a dose tóxica e a dose efetiva, avaliada pelo IS foram > 10 (Tab. 1). Este valor compreende uma estimativa da especificidade das amostras em teste uma vez que o cálculo é utilizado como uma forma de indicar e diferenciar compostos ativos contra *Plasmodium* spp. de compostos tóxicos no geral. Além de ser utilizado na análise de relação entre estrutura e atividade entre grupos de compostos relacionados com o fim de determinar as características que os conferem ou não atividade (Pezzuto *et al.* 1997).

A presença e/ou quantidades de compostos bioativos (metabólitos secundários) nas plantas são influenciadas pelos fatores edafoclimáticos, parte da planta utilizada, idade da planta, entre outros fatores (Freitas *et al.* 2004). Portanto, as diferenças de resultados observados em estudos realizados *in vitro* de partes de plantas utilizadas podem surgir pelo fato destas amostras serem coletadas em diferentes locais, diferentes épocas e, possivelmente, em plantas de diferentes idades. Tais diferenças de atividade antiplasmodial *in vitro* de algumas plantas também podem estar correlacionadas a fatores farmacológicos, pois alguns metabólitos podem estar atuando como pró-drogas, os quais devem sofrer alterações (químicas e estruturais) durante o metabolismo no organismo para se tornar ativas, como é o caso com o antimalárico biguanida, que é primeiro metabolizado a triazina, um metabólito de baixa ação e posteriormente a cicloguanil

(composto ativo) (Fidock *et al.* 1998).

Outro ponto importante a ser destacado são os resultados apresentados para o EAMG, as frações FHMg, FCIMg e FAcMG, pois estes podem estar correlacionados ao efeito sinérgico entre os metabólitos secundários existentes nestes, essa ação já foi observada com a combinação entre terpenoides e inibidores da atividade proteolítica do proteossomo, o que potencializou a ação antimalárica (Goulart 2006). Os compostos 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).

A ação parasitária do EAMG, das frações FHMg, FCIMg e FAcMG (rico em triterpenos) e dos triterpenos CQH-2 e CQH-3 também pode estar relacionadas com o rompimento da membrana plasmática do parasita, 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).

Outras prováveis explicações para a ação parasitária desses terpenoides seria a ativação da morte celular programada neste parasita, uma vez que este processo já foi identificado em *Plasmodium* (Meslin *et al.* 2011) e a interferência de uma ou mais substâncias no processo de diferenciação celular deste 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 que pode ocorrer em *Plasmodium*, além de outras espécies de protistas patogênicos (Duszenko *et al.* 2011).

CONCLUSÃO

No presente estudo, concluiu-se que todos os extratos e metabólitos secundários testados apresentaram atividade anti-*P. falciparum* frente à cepa 3D7, sendo estes promissores. Este trabalho vem comprovar a riqueza de metabólitos secundários ativos em *M. guianensis* e incentivar a continuidade do estudo fitoquímico desta espécie e de outras plantas do mesmo gênero encontradas na região amazônica, uma vez que a resistência do *P. falciparum* torna o arsenal profilático e terapêutico contra a malária bastante restrito.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à FIOCRUZ/Rondônia e à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro para execução deste trabalho.

REFERÊNCIAS

- 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.L.P. 2011. Constituintes químicos e atividade leishmanicida de *Gustavia elliptica* (Lecythidaceae). *Química Nova*, 34: 1182-1187.
- BEGUM, S., AYUB, A., QAMAR ZEHRA, S., SHAHEEN SIDDIQUI, B. & IQBAL CHOUDHARY, M.S. 2014. Leishmanicidal Triterpenes from *Lantana camara*. *Chemistry & Biodiversity*, 11: 709-718.
- BERNAL, F.A. & COY-BARRERA, E. 2014. In-Silico Analyses of Sesquiterpene-Related Compounds on Selected Leishmania Enzyme-Based Targets. *Molecules*, 19: 5550-5569.
- BETACOR, C., FREIRE, R., GONZALES, A.G., SALAZAR, J.A., PASCARD, C. & PRANGE, T. 1980. Three triterpenes and other terpenoids from *Catha cassinoides*. *Phytochemistry*, 19: 1989-1993.
- BÉZIVIN, C., TOMASI S., LOHÉZIC-LE F.D. & BOUSTIE J. 2003. Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer cell lines. *Phytomedicine*, 10: 499-503.
- BORRAS, 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. 322 p.
- BRASIL. 2009. Guia prático de tratamento de malária no Brasil. Brasília, Ministério da Saúde. <http://bvsm.sau.gov.br/bvs/publicacoes/malaria_diag_manual_final.pdf>. Acesso em: 20 dez. 2014.
- CALVO-CALLE, J., MORENO, A., ELING, W. & NARDIN, E. 1994. *In vitro* development of infectious liver stages of *P. yoelii* and *P. berghei* malaria in human cell lines. *Experimental Parasitology*, 79: 362-373.
- CARVALHO-OKANO, R.M. & LEITÃO FILHO, H.F. 2004. O gênero *Maytenus* Mol. emend. Mol. (Celastraceae) no Brasil extra-amazônico. In: REIS, M.S. & SILVA, S.R. (Eds.). *Conservação e uso sustentável de plantas medicinais e aromáticas: Maytenus spp., espinheira-santa*. Brasília: IBAMA, p. 11-51.
- CLARKSON, C., MAHARAJ, V.J., CROUCH, N.R., GRACE, O.M., PILLAY, P., MATSABISA, M.G., BHAGWANDIN, N., SMITH, P.J. & FOLB, P.I. 2004. *In vitro* antiplasmodial activity of medicinal plants native to or naturalised in South Africa. *Journal of Ethnopharmacology*, 92: 177-191.
- COX-SINGH, J., DAVIS, T.M.E., LEE, K., SHAMSUL, S.S.G., MATUSOP, A., RATNAM, S., RAHMAN, H.A., CONWAY, D.J. & SINGH, B. 2008. *Plasmodium knowlesi* Malaria in Humans Is Widely Distributed and Potentially Life Threatening. *Clinical Infectious Diseases*, 46: 165-171.
- CUMBANE, V.S. 2011. *Resposta de anticorpos contra proteínas recombinantes baseadas em antígenos de merozoítos de Plasmodium vivax em indivíduos de uma comunidade rural da Amazônia brasileira*. 123 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.
- DA SILVA, M. G. 1990. *Análise da constituição química de raiz e folhas de Maytenus myrsinoides*. 113 f. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 1990.
- DANELLI, M.G., SOARES, D.C., ABREU, H.S., PEÇANHA, L.M. & SARAIVA, E.M. 2009. Leishmanicidal effect of LLD-3 (1), a nor-triterpene isolated from *Lophanthera lactescens*. *Phytochemistry*, 70: 608-614.
- DOS SANTOS, V.A., LEITE, K.M., SIQUEIRA, M., REGASINI, L.O. & MARTINEZ, I. 2013. Antiprotozoal Activity of Quinonemethide Triterpenes from *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae). *Molecules*, 18: 1053-1062.
- DUARTE, L.P., MIRANDA, R.R.S., RODRIGUES, S.B.V., SILVA, G.D.F., VIEIRA-FILHO, S.A. & KNUPP, V.F. 2009. Stereochemistry of 16a-Hydroxyfriedelin and 3-Oxo-16-methylfriedel-16-ene Established by 2D NMR Spectroscopy. *Molecules*, 14: 598-607.
- DUCKE, J.A. & VASQUEZ, R. 1994. *Amazonian Ethnobotanical Dictionary*. Florida: CRC Press. Boca Raton, USA. p. 114.
- DUSZENKO, M., GINGER, M.L., BRENNAND, A., GUALDRÓN-LÓPEZ, M., COLOMBO, M.I., COOMBS, G.H., COPPENS, I., JAYA-BALASINGHAM, B., 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. 2011. Autophagy in protists. *Autophagy*, 7: 127-158.
- FACUNDO, V.A., MENEGUETTI, D.U. DE O., MILITÃO, J.S.L.T., LIMA, R.A., BAY-HURTADO, F., CASSEB, A.A., TEIXEIRA, L.F., SILVA, I.C., DA SILVA, & G.V.J. LACERDA JUNIOR, V. 2015. Chemical constituents from *Maytenus guianensis* Klotzsch ex Reissek (Celastraceae) Amazon rainforest. *Biochemical Systematics and Ecology*, 58: 270-273.
- FIDOCK, A.D., NOMURA, T. & WELLEMS, E.T. 1998. Cycloguanil and its parent compound proguanil demonstrate distinctive activities against *Plasmodium falciparum* malaria parasites transformed with human dihydrofolate reductase. *Molecular Pharmacology*, 54: 1140-1147.
- FIVELMAN, Q.L., ADAGU, I.S. & WARHURST, D.C. 2004. Modified fixed-ratio isobologram method for studying *in vitro* interactions between atovaquone and proguanil or dihydroartemisinin against drug-resistant strains of *Plasmodium falciparum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48: 4097-4102.
- FREITAS, M.S.M., SOUZA, P.H., BELLO, O.I. & JAQUES, R.S. 2004. Crescimento e produção de fenóis totais em carqueja [*Baccharis trimera* (Less.) D.C.] em resposta à inoculação com fungos micorrízicos arbusculares, na presença e na ausência de adubação mineral. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, 6: 30-34.
- GOULART, H.R. 2006. *Atividade proteolítica do proteossomo em Plasmodium falciparum como um possível alvo de drogas antimaláricas*. 188 f. Tese (Doutorado em Ciências: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro) - Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.
- LAMBROS, C. & VANDERBERG, J. 1979. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *Journal Parasitology*, 65: 418-420.
- MACARI, P.A.T., PORTELA, C.N. & POHLIT, A.M., 2006. Antioxidant, cytotoxic and UVB-absorbing activity of *Maytenus guianensis* Klotzsch. (Celastraceae) bark extracts. *Acta Amazônica*, 36: 513-518.
- MADUREIRA, M.C., MARTINS, A.P., GOMES, M., PAIVA, J., PROENÇA DA CUNHA, A. & ROSÁRIO, V. 2002. Antimalarial activity of medicinal plants used in traditional medicine in S. Tomé and Príncipe islands. *Journal of Ethnopharmacology*, 8: 23-29.
- MAES, L., GERMONPREZ, N., QUIRJEN, L., VAN PUYVELDE, L., COS, P. & VANDEN BERGHE, D., 2004. Comparative activities of the triterpene saponin maesabalide III and liposomal amphotericin B (AmBisome) against *Leishmania donovani* in hamsters. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48: 2056-2060.
- MALEBO, H.M., TANJA, W., CAL, M., SWALEH, S.A. M., OMOLO, M.O., HASSANALI, A., SÉQUIN, U., HAMBURGER, M., BRUN, R. & NDIEGE, I.O. 2009. Antiplasmodial, anti-trypanosomal, anti-leishmanial and cytotoxicity activity of selected Tanzanian medicinal plants. *Tanzania Journal of Health Research*, 11: 226-234.
- MARR, A.K., MCGWIRE, B.S. & MCMASTER, W.R. 2012. Modes of action of leishmanicidal antimicrobial peptides. *Future Microbiology*, 7: 1047-1059.
- MESLIN, B., ZALILA, H., FASEL, N., PICOT, S. & BIENVENU, A.L., 2011. Are protozoan metacaspases potential parasite killers? *Parasites & Vectors*, 4: 1-7.
- 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., MUNGA, G.M. & NJAGI, E.N. 2007. Antimalarial activity of some plants traditionally used in treatment of malaria in Kwale District of Kenya. *Journal of Ethnopharmacology*, 112: 545-551.
- NOEDL, H.C., WONGSRICHANALAI, R., MILLER, K., MYINT, S., LOOAREESUWAN, Y., SUKTHANA, V., WONGCHOTIGUL, H., KOLLARITSCH, G. & WIEDERMANN, W. 2002. *Plasmodium falciparum*: effect of anti-malarial drugs on the production and secretion

- characteristics of histidine-rich protein II. *Experimental Parasitology*, 102: 157-163.
- NUNES, M.S. & FERREIRA, M.U. 2005. Diagnóstico e tratamento da malária: estado atual e perspectivas. *Diagnóstico & tratamento*, 10: 4-12.
- OLIVEIRA, M.L.G. 2007. *Estudo fitoquímico de folhas de Maytenus gonoclada Martius (Celastraceae) e obtenção de derivados nitrogenados da 3-oxo-friedelano*. 163f. Dissertação (Mestrado em Química) - Departamento de Química. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.
- OMS, 2013. Organização Mundial De Saúde. Disponível em: <http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2013/wmr2013_no_profiles.pdf>. Acesso em: 25 out. 2014.
- PEZZUTO, J.M., ANGERHOFER, C.K. & MEHDI, H. 1997. Studies in natural products chemistry: Structure and chemistry (Part F). *Atta-ur-Rahman*, 20: 507-560.
- PESSUTO, M.B. 2006. *Análise fitoquímica do extrato de folhas de Maytenus ilicifolia Mart Ex Reis e avaliação do potencial antioxidante*. 105 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Departamento de Farmácia e Farmacologia. Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2006.
- RANG H.P., DALE M.M., RITTER J.M., FLOWER R.J., HENDERSON. G. 2012. *Farmacologia*. 7. ed. Elsevier Editora Ltda. Rio de Janeiro. 642 p.
- REVILLA, J. 2002. *Plantas úteis da bacia amazônica*. Manaus: SEBRAE-AM/INPA. 445p.
- 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. 2014. Activity of cycloartane-type triterpenes and sterols isolated from *Musa paradisica* fruit peel against *Leishmania infantum chagasi*. *Phytomedicine*, 21: 1419-1423.
- SUFFNESS, M. & PEZZUTO, J.M. 1990. Assays related to cancer drug discovery. In: Hostettmann K, (ED.). *Methods in plant biochemistry: assays for bioactivity*. London: Academic Press. p. 71-133.
- 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. 2008. Trypanocidal and leishmanicidal activities of sesquiterpene lactones from *Ambrosia tenuifolia* Sprengel (Asteraceae). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52: 2415-2419.
- TELES, C.B.G., MOREIRA, L.S., SILVA, A.A.E., FACUNDO, V.A., ZULIANI, J.P., STÁBELI, R.G. & SILVA-JARDIM, I. 2011. Activity of the Lupane isolated from *Combretum lerosum* against *Leishmania amazonensis* promastigotes. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 22: 936-942.
- TOLEDO, J.S., AMBRÓSIO, S.R., BORGES, C.H., MANFRIM, V., CERRI, D.G., CRUZ, A.K. & DA COSTA, F.B. 2014. *In vitro* leishmanicidal activities of sesquiterpene lactones from *Tithonia diversifolia* against *Leishmania braziliensis* promastigotes and amastigotes. *Molecules*, 19: 6070-6079.
- TORRES-SANTOS, E.C., LOPES, D., OLIVEIRA, R.R., CARAUTA, J.P., FALCAO, C.A., KAPLAN, M.A. & ROSSI-BERGAMANN. 2004. Antileishmanial activity of isolated triterpenoids from *Pourouma guianensis*. *Phytomedicine*, 11: 114-120.
- TRAGER, W. & JENSEN, J. 1976. Human malaria parasites in continuous culture. *Science*, 193: 673-675.