



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA**



CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA

**Estudo fitoquímico e farmacológico das espécies
Ximenia americana L. e *Cecropia pachystachya* Tréc.**

Valdiléia Teixeira Uchôa

Orientado: Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana

Co- Orientadora: Prof(a). Dra. Mariana Helena Chaves

Maceió – AL

Julho/2009

VALDILÉIA TEIXEIRA UCHÔA

**Estudo fitoquímico e farmacológico das espécies
Ximenia americana L. e *Cecropia pachystachya* Tréc.**

**Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação
em Química e biotecnologia da Universidade
Federal de Alagoas, para obtenção do título
de Doutor em Ciências, com área de
concentração em Química e Biotecnologia.**

Catlogação na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

- U17e Uchôa, Valdiléia Teixeira.
 Estudo fitoquímico e farmacológico das espécies *Ximenia americana* L. e
 Cecropia pachystachya Tréel / Valdiléia Teixeira Uchôa, 2009.
 247 f. : il. tabs., grafs.
- Orientador: Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana.
 Co- Orientadora Mariana Helena Chaves.
 Tese (doutorado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de
 Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2009.
- Bibliografia: f. 226-228.
 Anexos: f. 229-247.
1. Fitoquímica. 2. *Ximenia americana*. 3. *Cecropia pachystachya*. I. Título.

CDU: 547.9



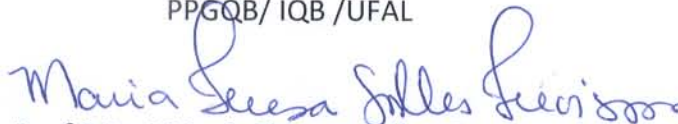
UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA

BR 104 Km14, Campus A. C. Simões
Cidade Universitária
Tabuleiro dos Martins
57072-970, Maceió-AL, Brasil
Fone: (82) 3214-1384, Fax: (82) 3214-1384
Email: cpgqb@qui.ufal.br

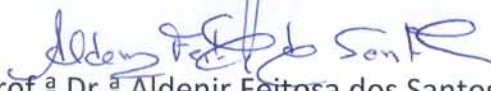
Membros da Comissão Julgadora da Defesa de Tese de Doutorado de **Valdiléia Teixeira Uchôa**, intitulada: "**Estudo Fitoquímico e Farmacológico das Espécies *Ximenia americana* L. e *Cecropia pachystachya* Trec.**", apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas em 31 de julho de 2009, às 9h, na Sala de Reuniões do IQB/UFAL.

COMISSÃO JULGADORA


Prof.º Dr.º Antônio Euzebio Goulart Sant'Ana
Orientador
PPGQB/ IQB /UFAL


Prof.ª Dr.ª Maria Teresa Salles Trevisan
UFCE


Prof.º Dr.º Brás Heleno de Oliveira
UFPR


Prof.ª Dr.ª Aldenir Feitosa dos Santos
UNEAL


Prof.ª Dr.ª Ruth Rufino do Nascimento
PPGQB/IQB/UFAL

“Dedico este trabalho aos meus pais,
Gustavo de Sousa Uchôa Neto e
Francisca Alves Teixeira Uchôa,
modelos de vida, pelo amor, apoio e
incentivo constante em minha formação
humana e profissional.”

AGRADECIMENTO ESPECIAL

- ❖ A **Deus**, que sempre esteve presente iluminando todos os momentos de minha vida e a **Nossa Senhora**, minha eterna intercessora.
- ❖ Ao meu filho **Gustavo Uchôa Barros**, fonte de alegria, amor, luz da minha vida e por entender a ausência constante de sua mãe.
- ❖ Ao meu marido **Romero Barros Soares**, pelo carinho, dedicação e incentivos constantes no término deste trabalho.
- ❖ Ao Prof. **Dr. Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana**, por ter me aceitado como sua orientada e pelos ensinamentos e incentivos em todos os momentos da realização deste trabalho.
- ❖ A **Prof(a) Dra. Mariana Helena Chaves**, por ter me aceitado como sua orientada e pelos ensinamentos e incentivos em todos os momentos da realização deste trabalho.
- ❖ À minha irmã **Vânia Uchôa** e aos meus tios **Francisca das Chagas, Raimundo, Francisca de Fátima, José Solon e Francisca Barbosa**, pelo os incentivos durante a realização deste trabalho.
- ❖ À minha sogra **Vanacy Soares**, aos meus cunhados **Vânia Verçosa, José Verçosa, Rinaldo Barros, Roseane Predes** e as sobrinhas **Maria Caroline e Maria Camilla**, pelo os incentivos e compreensão durante a realização deste trabalho.
- ❖ Às minhas amigas **Raquel, Josiane, Emília, Cenira, Mariane, Hilris e Danielle** pelos ensinamentos, paciência e fidelidade durante todo o trabalho.
- ❖ Aos Profs. **José Arimatéia, Edson Bento, José Moita, Graça Citó, Magna Suzana** pela amizade, incentivo constante e ensinamentos durante todo este trabalho

AGRADECIMENTO

- ❖ À **Universidade Federal de Alagoas (UFAL)**, pela oportunidade de realizar o curso.
- ❖ À **Universidade Federal do Piauí (UFPI)**, pela oportunidade de realizar os experimentos para o término do curso.
- ❖ À **CAPES**, pela concessão da bolsa de estudo.
- ❖ À **Profa. Dra. Antoniana U. Krettli** do Centro de Pesquisa René Rachou – BH, pela realização dos bioensaios antimaláricos *in vivo* e *in vitro*.
- ❖ Ao **Prof. Dra. Magna Suzana e a aluna Thais Carvalho** do Laboratório de Farmacologia e Imunidade (ICBS) da Universidade Federal de Alagoas, pela realização dos ensaios farmacológicos.
- ❖ Aos **professores João Xavier, Bárbara, Lúcia Conserva, Luiz Carlos, Edson Bento, Paulo César, Mário Menegeth e Carlos Simone** da Universidade Federal de Alagoas, pelo incentivo e amizade nesta longa caminhada.
- ❖ Aos professores **Magna Suzana, Bruno, Iara, Josiane Luna e João Xavier**, pelas sugestões e contribuições no exame de qualificação.
- ❖ Aos professores **Marília, Margarida e Lúcia Conserva**, do Instituto de Química (UFAL), pelos ensinamentos.
- ❖ Ao amigo **Aldy**, pela coleta das plantas, amizade e por sempre ter se mostrado eficiente e sempre prestativo.
- ❖ As amigas **Josiane, Cenira e Roseane**, pela amizade e ajuda na condução do trabalho no laboratório, sempre se mostrando eficientes e prestativas.
- ❖ Aos amigos do laboratório e conquistados, pela ótima convivência.

SUMÁRIO

Descrição	Página
Lista de Figuras	x
Lista de Tabelas	xii
Lista de Abreviaturas, siglas e símbolos	xiv
Apresentação	16
Objetivos	20
Capítulo 1. Estudo fitoquímico e biológico das famílias Cecropiaceae e Olacaceae com ênfase nas espécies <i>Cecropia pachystachya</i> Tréc. e <i>Ximenia americana</i> L.	
Resumo	22
Abstract	22
Introdução	23
Metodologia	24
Resultados e Discussão	24
Fitoquímico e propriedades biológicas da família Olacaceae	24
Fitoquímico e propriedades biológicas da espécie <i>Ximenia americana</i> L.	29
Fitoquímico e propriedades biológicas da família Cecropiaceae	30
Fitoquímico e propriedades biológicas da espécie <i>Cecropia pachystachya</i> Tréc.	33
Conclusões	34
Referências	34
Capítulo 2. Extratos e compostos de planta com atividade antimalárica <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	
Resumo	57
Abstract	57
Introdução	58
Metodologia	60
Resultados e Discussão	61
Conclusões	69
Referências	92
Capítulo 3. Avaliação da atividade antimalárica da <i>Ximenia americana</i> L.	
Resumo	109
Abstract	110
Introdução	110
Materiais e Métodos	112
Procedimento geral experimental	112
Planta	112
Extração e Fracionamento	113
Isolamento fitoquímico	114
Teste de atividade antimalárica <i>in vitro</i>	115
Teste de atividade antimalárica <i>in vivo</i>	116

Identificação das substâncias XACC-1 e FOXA-7	117
Resultados e Discussões	118
Conclusão	120
Referências	120
Capítulo 4. Antimalarial activity of compouds and mixed fractions of <i>Cecropia pachystachya</i> Tréc.	
Abstract	132
Introduction	133
Experimental	135
Experimental procedures, plant material e fractionation	135
Plant materials	135
Preparation of extracts	135
Fractionation of the root extract	136
Identification of tormentic acid	137
Antimalarial tests against <i>P. falciparum</i>	138
The continuous cultures of <i>P. falciparum</i> and antimalarial tests	138
The tradicional microscopy test	139
The hypoxanthine test	139
The ELISA-HRP2	140
Antimalarial tests <i>in vivo</i> against <i>P. berghei</i>	140
Cytotoxicity tests with a human hepatoma cell times	141
Results and Discussion	142
Conclusions	145
Acknowledgments	145
References	146
Capítulo 5. Atividade antioxidante das cascas do caule e folhas da <i>Ximenia americana</i> L.	
Resumo	166
Abstract	166
Introdução	167
Materiais e Métodos	168
Procedimento experimental	168
Material vegetal	169
Extração e fracionamento da planta	169
Isolamento fitoquímico	170
Determinação de fenóis totais	171
Análise quantitativa da atividade antioxidante	172
Construção da curva de calibração do DPPH	172
Leitura das medidas de absorbância nas amostras	172
Análise estatística	173
Resultados e Discussões	174
Identificação estrutural das substâncias isoladas	174
Atividade antioxidante <i>in vitro</i>	175
Conclusão	178
Referências	178

Capítulo 6. Antinociceptive and anti-inflammatory avaluation of extract, fractions and a catechin isolated from stem bark of *Ximenia americana* L. (Olacaceae)

Abstract	189
Introduction	190
Materials and Methods	191
Plant material	191
Extraction and isolation	191
Pharmacological procedures	192
Animals	192
Agents	192
Acetic acid-induced writhing in mice	192
Formalin test in mice	193
Hot-plate test in mice	193
Zymosan-induced peritonitis in mice	194
Statistical analysis	194
Results	194
Acetic acid-induced writhing in mice	194
Formalin test	195
Hot plate test	195
Zymosan-induced peritoned inflammations	195
Discussion	196
Conclusion	198
Acknowledgements	199
References	199

Capítulo 7. Constituintes químicos da *Cecropia pachystachya* Tréc.

Resumo	209
Abstract	209
Introdução	209
Resultados e discussões	210
Experimental	214
Procedimentos gerais	214
Material botânico	215
Preparação dos extratos etanólicos	215
Fracionamento do extrato etanólicos das raízes	215
Referência	217
Conclusões Gerais	224
Referências	227
Anexos	229

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

FIGURA Nº 01 – Constituintes químicos da família Olacaceae.....	25
FIGURA Nº 02 – <i>Ximenia americana</i> L.....	28
FIGURA Nº 03 – Compostos isolados da família Cecropiaceae	28
FIGURA Nº 04 – <i>Cecropia pachystachya</i>	29

CAPÍTULO II

FIGURA Nº 01 – Compostos atualmente usados como antimaláricos	15
FIGURA Nº 02 – Estrutura dos compostos testados quanto a atividade antimalárica <i>in vivo</i> e/ou <i>in vitro</i>	16

CAPÍTULO III

FIGURA Nº 01 – Substâncias isoladas 1 e 2 da <i>X. americana</i>	20
FIGURA Nº 02 – Redução da parasitemia dos testes antimaláricos <i>in vitro</i> realizado com os compostos isolados da <i>Ximenia americana</i> L	22

CAPÍTULO IV

FIGURA Nº 01- Ácido tormêntico	21
FIGURA Nº 02 – Sitosterol	21
FIGURA Nº 03 – Curvas dose-resposta, representando os efeitos do ácido tormêntico (A) e da mistura do ácido tormêntico com β -sitosterol (1:1) (B), sobre o crescimento da linhagem W2 do <i>Plasmodium falciparum</i> . Cada ponto representa a média de um mesmo teste em triplicata	22
FIGURA Nº 04 – Curvas dose-resposta, representando os efeitos do ácido tormêntico, sobre o crescimento da linhagem W2 do <i>Plasmodium falciparum</i> . Cada ponto representa a média de um mesmo teste em triplicata	22

CAPÍTULO V

FIGURA Nº 01 – Substâncias isoladas do extrato EtOH da <i>X. americana</i>	18
---	----

FIGURA Nº 02 – Atividade sequestrante de radicais dos extratos EtOH da <i>Ximenia americana</i> versus rutina (grupo controle)	18
FIGURA Nº 03 – Atividade sequestrante de radicais das frações da partição líquido-líquido das folhas e casca do caule da <i>X. americana</i>	19
FIGURA Nº 04 – Atividade sequestrante de radicais dos compostos isolados da <i>X. americana</i> e controles na concentração de 50 µg/mL	19
FIGURA Nº 05 – % DPPH rem das amostras na concentração em 100 µg/mL	20

CAPÍTULO VI

FIGURA Nº 01 – Chemical structures of epicatechin (1), a compound isolated from <i>X. Americana</i>	17
FIGURA Nº 02 – Dose-response curves of Xm-catechin (▲) and dypirone (■) (all in doses of 1, 10, 30, 100 and 300 µmol/Kg, i.p.) on the 0.6% acetic acid-induced abdominal constrictions observed for 20 min five minutes after the administration of acetic acid.. Data are expressed as the inhibition percentage of total writhings calculated from eight animals. ** <i>P</i> < 0.01 (ANOVA followed by Dunnett's test)	17
FIGURA Nº 03 – Effect of indomethacin and Xm-catechin (both 100 µmol/Kg, i.p.), ethanolic extract and ethyl acetate fraction (both 100 mg/Kg, i.p.), on cell migration. Mice were killed at the time-point of 6 h after zymosan-induced peritonitis. Total cell migration was counted using a Neubauer chamber. Data represent mean±S.E.M. from at least six animals.* <i>P</i> < 0.05 ; ** <i>P</i> < 0.01.	18

CAPÍTULO VII

FIGURA Nº 01 – Estrutura das substâncias isoladas do caule e raiz da <i>C. pachystachya</i>	16
--	----

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

TABELA 01 – Atividades biológicas e constituintes químicos das famílias Cecropiaceae e Olacaceae..30

CAPÍTULO II

TABELA 01 – Relação de plantas com atividade antimalárica *in vivo* e/ou *in vitro* 20

CAPÍTULO III

TABELA 01 - Atividade antimalárica em teste *in vivo* e *in vitro* dos extratos etanólicos da *Ximenia americana* 19

TABELA 02 - Atividade antimalárica em teste *in vivo* das frações da casca do caule, madeira do caule e folhas da *Ximenia americana* 20

TABELA 03 – Inibição do crescimento de *P. falciparum* *in vitro* (W2) e IC50 dos compostos extraídos das frações acetanólicas da *Ximenia americana* testados em diferentes concentrações pelo método da Hipoxantina, em paralelo com a cloroquina..... 21

CAPÍTULO IV

TABELA 01 - Atividade antimalárica *in vivo* dos extratos etanólicos da *Cecropia pachystachya*..... 18

TABELA 02 - Atividade antimalárica *in vivo* das frações da partição do extrato etanólico da madeira da raiz da *Cecropia. pachystachya* 19

TABELA 03 - Atividade antimalárica *in vivo* das subfrações da fração MRP1 submetida a fracionamento da madeira da raiz da *Cecropia pachystachya* 20

TABELA 04 - Atividade antimalárica do ácido tormêntico e β -sitosterol no teste com *Plasmodium berghei* em camundogos medida pela redução da parasitemia em relação aos controles nos dias 5 e 8 após inoculação do parasito..... 23

TABELA 05 – Comparando dados do RMN ^1H e ^{13}C do composto CPMR-6 com Ácido Tormêntico.... 24

CAPÍTULO V

TABELA 01 – Conteúdo de fenóis totais (FT) e atividade sequestrante de radicais (CE_{50}) dos extratos EtOH e frações da *X. americana* 21

CAPÍTULO VI

TABLE 01 - Antinociceptive effect of the extract, fractions and catechin isolated from *X. americana* on acetic-induced abdominal writhing in mice..... 19

TABLE 02 - Power and efficacy of dypirone and Xm-catechin in acetic acid-induced writhing in mice 19

TABLE 03- Anti-inflammatory profile of Xm-catechin, ethanolic extract and fractions of <i>X. americana</i> in the formalin test	20
--	----

xiii

TABLE 04 - Effects of ethyl acetate fraction and Xm-catechin of <i>X. americana</i> on mice in the hot plate test	20
--	----

CAPÍTULO VII

TABELA 01 – Deslocamento química de RMN ¹³ C dos composto isolados	17
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

^{13}C RMN	Ressonância magnética nuclear do isótopo do ^{13}C
^1H RMN	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
AcOEt	Acetato de etila
CE ₅₀	Concentração efetiva em 50%
CC	Cromatografia em coluna
CCD	Cromatografia em camada delgada
CHCl_3	Clorofórmio
CH_2Cl_2	Dicloro-metano
C_6H_{14}	Hexano
cm^{-1}	Centímetros
<i>d</i>	Dupleto
<i>dd</i>	Duplo dupleto
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer (Transferência de polarização pela amplificação das distorções)
DMSO	1,2-Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2-Difenil-1-picril-hidrazila
EAG	Equivalentes de ácido gálico
EtOH	Etanol
FOXA-7	Folha – Ximenia americana -7
FT	Fenóis totais
g	grama
h	Hora
H_2O	Água
IC ₅₀	Concentração inibitória 50%
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento
Kg	Kilograma
MeOH	Metanol

mg	miligrama
MHz	Megahertz
mL	mililitro
NT	Não testado
s	simpleto
t	tripeto
XACC-1	Ximenia americana – casca do caule -1
UV	Ultravioleta
WHO	World Health Organization (Organização Mundial de Saúde)
δ	Deslocamento químico em ppm
μ L	Microlitro
μ g	Micrograma
μ M	Micromolar

APRESENTAÇÃO

Desde o início da civilização o homem vem buscando na natureza soluções para o combate de enfermidades que cercam seu cotidiano. Isto pode ser constatado desde o homem pré-histórico que costumava observar os atos dos animais em detrimento às doenças que os acometiam (Di Stasi, 1996).

Os índios também contribuíram para descoberta de plantas medicinais, seguindo um modelo parecido de observação, no entanto, acrescido de manipulação e experimentação. Com a interferência do homem civilizado, aplicando estudos na busca de meios para a cura de doenças e epidemias que assolavam as cidades no início do século XX (Coutinho et al., 2002).

O estudo de plantas medicinais desenvolveu-se com muita aplicabilidade, facilitado pelo desenvolvimento da química experimental em meados do século XIX, o que levou às experiências de extração de princípios ativos vegetais (Bresolin & Cechinel-Filho, 2003).

Sabendo-se então que as plantas desempenhavam papel importante nos males existentes na sua vida cotidiana, o homem moderno começou a se interessar em aplicar preparados vegetais de plantas medicinais para as enfermidades que o viessem acometer, baseava-se na a experiência popular (Yunes e Cechinel-Filho, 2007; Parveen et al., 2007). A cultura popular brasileira é particularmente rica no uso das plantas medicinais. Entretanto, o Brasil tem utilizado apenas uma pequena percentagem da sua biodiversidade e do conhecimento popular para a pesquisa e desenvolvimento de agentes fitoterápicos (Calixto, 2005).

Atualmente o estudo das plantas medicinais vem retomando um papel de destaque e acreditamos que com esta valorização teremos no futuro próximo mais agentes fitoterápicos disponíveis no mercado e as plantas medicinais validadas. Neste trabalho estamos descrevendo o estudo de duas espécies de plantas de uso popular que estão sendo investigadas para confirmação de suas atividades farmacológicas, são as espécies *Cecropia pachystachya* Tréc. (Cecropiaceae) e *Ximenia americana* L. (Olacaceae), plantas facilmente encontradas no nordeste brasileiro, que

apresentam atividade antiinflamatória, antibacteriana, antidepressiva, antineoplásica etc, (Omer & Elimina, 2003; Consolini et al., 2006), cujo estudo deverá ser continuado em profundidade para conhecermos todo seu potencial terapêutico. Este trabalho, dividido em capítulos, nos proporcionará conhecer as diversas informações biológicas e fitoquímicas sobre as famílias Cecropiaceae e Olacaceae, enfatizando principalmente as espécies *C. pachystachya* e *X. americana*.

O capítulo 1 trata de uma revisão bibliográfica sobre as famílias Cecropiaceae e Olacaceae, com ênfase nas espécies *C. pachystachya* e *X. americana* destacando informações como características físicas, gêneros, espécies, uso na medicina popular, constituintes químicos presentes e atividades farmacológicas.

O capítulo 2 apresenta uma revisão bibliográfica sobre famílias e espécies de plantas de todo o mundo que apresentam extratos, frações e compostos com atividade antimalárica *in vitro* e/ou *in vivo*, frente às várias cepas do *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium berghei*.

O capítulo 3 refere-se a atividade antimalárica *in vitro* e *in vivo* contra cepas do *P. falciparum* e *P. berghei* dos extratos, frações e compostos isolados da espécie *X. americana* L., estudada nos Laboratórios do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas e no Laboratório de Malária do Centro de Pesquisa René Rachou - FIOCRUZ em Belo Horizonte.

O capítulo 4 analisa a atividade antimalárica *in vitro* e *in vivo* contra cepas do *P. falciparum* e *P. berghei*, respectivamente, dos extratos, frações e compostos obtidos da espécie *C. pachystachya* L., estudada nos Laboratórios do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas e no Laboratório de Malária do Centro de Pesquisa René Rachou – FIOCRUZ em Belo Horizonte.

O capítulo 5 avalia a atividade sequestrante de radicais pelo método DPPH dos extratos, frações e compostos da espécie *X. americana* L., estudada nos Laboratórios do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas e Universidade Federal do Piauí.

O capítulo 6 apresenta a atividade antiinflamatória e antinociceptiva pelos métodos de contorções abdominais induzidas por ácido acético, teste de formalina, ensaio de “hot plate” e peritonite induzido por zimosan, dos extratos, frações e compostos da espécie *X. americana* L., estudada nos Laboratórios do Instituto de Química e Biotecnologia e Laboratório de Farmacologia e Imunidade (ICBS) da Universidade Federal de Alagoas.

O capítulo 7 mostra o estudo fitoquímico das raízes e caule da espécie *C. pachystachya* L., isolados e identificados nos Laboratórios de Produtos Naturais do Instituto de Química da Universidade Federal de Alagoas.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL:

Contribuir para o estudo fitoquímico e farmacológico das espécies *Cecropia pachystachya* Tréc. (Cecropiaceae) e *Ximenia americana* L. (Olacaceae)

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- ✓ Estudar as características físicas, biológicas e químicas das famílias Cecropiaceae e Olacaceae com ênfase nas espécies *C. pachystachya* e *X. americana*.
- ✓ Relacionar as famílias e espécies com atividade antimalárica *in vitro* e *in vivo*.
- ✓ Avaliar o potencial antimalárico dos extratos, frações e compostos isolados da espécie *X. americana* (Olacaceae) frente as cepas de *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium berghei*.
- ✓ Avaliar o potencial antimalárico dos extratos, frações e compostos isolados da espécie *C. pachystachya* (Cecropiaceae) frente as cepas de *P. falciparum* e *P. berghei*.
- ✓ Avaliar a atividade sequestrante de radical com DPPH e o teor de fenóis totais dos extratos, frações e compostos isolados da espécie *X. americana* (Olacaceae).
- ✓ Avaliar a atividade antiinflamatória e antinociceptiva dos extratos, frações e compostos isolados da espécie *X. americana* (Olacaceae).
- ✓ Isolar e identificar as substâncias do extrato etanólico das raízes da espécie *C. pachystachya* (Cecropiaceae).

CAPÍTULO 1

Atividades biológicas e constituintes químicos das famílias Cecropiaceae e Olacaceae com ênfase nas espécies *Cecropia pachystachya* Tréc. e *Ximenia americana* L.

(Artigo a ser submetido à Revista Brasileira de Farmacognosia)

Atividades biológicas e constituintes químicos das famílias Cecropiaceae e Olacaceae com ênfase nas espécies *Cecropia pachystachya* Tréc. e *Ximenia americana* L.

Valdiléia Teixeira Uchoa¹ e Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana^{1*}

¹Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, 57072-970, Maceió, AL, Brasil.

*E-mail: aegs@qui.ufal.br, Tel. =+55-82-32141388

RESUMO: As famílias Olacaceae e Cecropiaceae são distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais. No Brasil espécies destas famílias são encontradas com frequência no nordeste, destacando-se as espécies *Ximenia americana* L. e *Cecropia pachystachya* Tréc. Neste trabalho foi realizada uma revisão bibliográfica relativa a estudos fitoquímicos e biológicos destas famílias, enfatizando principalmente as espécies *X. americana* e *C. pachystachya*. As plantas da família Olacaceae possuem atividades antibacteriana, antiinflamatória, antineoplásica e antidepressiva e é rica em ácidos graxos, flavonóides, terpenos e alcalóides. As plantas da família Cecropiaceae possuem atividades anti-hipertensiva, cardiotônica, hipoglicemiante, antiinflamatória e apresenta como componentes principais flavonóides e terpenos em sua composição fitoquímica.

Unitermos: Cecropiaceae, Olacaceae, *Ximenia americana*, *Cecropia pachystachya*

ABSTRACT: The families Olacaceae and Cecropiaceae are distributed in tropical and subtropical regions. In Brazil, species are often found in the northeast, especially the species *Ximena americana* L. and *Cecropia pachystachya* Trec. We performed a literature review to determine the phytochemical and biological properties of the plants families from Olacaceae and

Cecropiaceae, emphasizing mainly the species *X. americana* and *C. pachystachya*. After analyzing the results it was possible to observe that the plants of family Olacaceae has antibacterial, anti-inflammatory, antidepressant and antineoplastic activities and it is rich in fatty acids, flavonoids, terpenes and alkaloids. Plants from the family Cecropiaceae have antihypertensive, cardiotonic, hypoglycemics and antiinflammatory activities, flavonoids and terpenes their represent phytochemical composition.

Keyword: Cecropiaceae, Olacaceae, *Ximenia americana*, *Cecropia pachystachya*

INTRODUÇÃO

A família Olacaceae ocorre predominantemente nas regiões tropicais e subtropicais e compreende 26-30 gêneros e 250 espécies. Seus representantes são árvores ou arbustos lenhosos (Thunfrot *et al.*, 1993; Souza & Lorenzi, 2005). As árvores são de porte médio a alto, geralmente semi-parasitadas por formigas desde a raiz (Thunfrot *et al.*, 1993). No Brasil são encontrados 13 gêneros e cerca de 60 espécies, sendo o gênero *Ximenia* o mais abundante da família (Matos, 2007). Os flavonóides são geralmente encontrados em toda a família Olacaceae (66,7% das espécies estudadas possuem apigenina (65) e 50% luteolina (66)) (Haron & Pingt, 1997). Cerca de 83,3% das espécies estudadas, têm a presença de quercetina (67) e o canferol (68), encontrados em abundância na espécie *Olex scandens*. As proantocianidinas estão presentes apenas nos gêneros *Ximenia*, *Scorodocarpus* e *Strombosia* (Haron & Pingt, 1997).

A família Cecropiaceae compreende 6 gêneros e possuem de 180 a 200 espécies distribuídas nos trópicos (Oliveira *et al.*, 2005). Os gêneros são: *Cecropia* Loefl., *Coussapoa* Aubl. e *Pourouma* Aubl. (América); *Myrianthus* P. Beauv., *Musanga* R. Brown (África) e *Poikilospermum* Zipp. ex Miq. (restringida a região Asia-Australia) (Carvajal & González-Villarreal, 2005). As espécies do gênero denominado *Cecropia* são comuns em todo território

brasileiro, somente poucas espécies como *Cecropia pachystachya* podem ser encontradas nas regiões secas do nordeste (Berg, 1996; Carauta, 1993). Na parte central e no sul do Brasil, deste gênero é representado por três espécies, *C. hololeuca* e *C. glasioui* que são usualmente encontradas em encostas de áreas fechadas e *C. pachystachya* que é encontrada em encostas de área aberta (Berg, 1996), suas sementes são pequenas e numerosas e os frutos que são dispersados por pássaros e morcegos (Gandolfi, 2000).

METODOLOGIA

Para a realização dessa revisão foram utilizadas as bases de dados Web of Science, Sciencedirect, Periódicos CAPES, Scielo e Scirus, utilizando como descritores “Cecropiaceae, Olacaceae, *Cecropia pachystachya* e *Ximenia americana*”. Para as famílias e as espécies buscou-se informações sobre o uso popular, atividade biológica e composição fitoquímica. Estas informações descritas na forma de texto, na tabela 01 encontram-se as espécies das famílias (Cecropiaceae e Olacaceae) como suas atividade biológicas e os constituintes químicos com suas respectivas estruturas e numerados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Fitoquímica e propriedades biológicas da família Olacaceae

Dos galhos da *Ochanostachys amentacea* foram isolados os ácidos minquartinóico (**1**), ácido 18-hidroxiinquartinóico (**2**) e ácido *E*-15,16-dihidrominquartinóico (**3**). O decocto de suas folhas é utilizada como antipirética na medicina tradicional da Indonésia (Sabitha et al., 2006; Ito et al., 2001).

O ácido minquartinoico (**1**), também foi isolado nas cascas do caule da *Coula edulis* e *Minquartia guianensis*. A *Coula edulis*, é uma árvore com cerca de 10 m de altura, principalmente encontrada em floresta equatorial dos Camarões, Zaire e África, o seu fruto possui nozes de grande valor nutricional é largamente usado na culinária destes países (Tchiegang et al., 2007), das cascas do caule desta planta, foram isolados ainda os compostos fenólicos cianidina (**69**), ácido elágico (**70**) e ácido gálico (**48**) (Fort et al., 2000).

A *Minquartia guianensis* é uma árvore que cresce cerca de 30 m de altura, tem um tronco marrom-escuro acinzentado, duro, pesado, usado na indústria ferroviária e na construção de casas (Jayasuriya et al., 2005). Esta espécie está dispersa na América Central e na Bacia Amazônica, das cascas do caule de *M. guianensis* coletadas no Equador isolou-se o ácido minquartinóico (**1**) e algumas populações indígenas do Equador usam a infusão das cascas no tratamento de infecções intestinais causadas por parasitas, contra dores musculares e irritações cutâneas (Cursino et al., 2009). Triterpenos foram isolados do extrato em metanol das cascas do caule da *M. guianensis* como o policarpol (**4**) (Jayasuriya et al., 2005), liquexantona (**5**), eritrodiol (**6**), betulino (**7**) (El-Seedi et al., 1994) e lupeol (**31**) (Cursino et al., 2009).

Liriosma ovata é uma árvore nativa na Amazônia Brasileira e do nordeste brasileiro. Tribos indígenas do Brasil utilizam a infusão das raízes e cascas desta planta para o tratamento da impotência sexual, problemas neuromusculares, reumatismo, problemas cardíacos, gastrointestinais e para prevenir a calvície (Picerno et al., 2008). Do extrato em metanol das cascas do caule da *L. ovata* foram isolados dois glicosídeos isoprenóides $1\alpha(\beta\text{-D-glicopiranosilosil)eudesma-3}\alpha,4\beta,11\text{-triol}$ (**8**) e $3\alpha,6\alpha\text{-dihidroximegastigman-7-en-9-ona-3-O-}\beta\text{-D-apiofuranosil-(1}\rightarrow\text{6)-}\beta\text{-D-glicopiranosideo}$ (**9**) Já do extrato em clorofórmio foi isolado o isopropil- $\beta\text{-D-apiofuranosil-(1}\rightarrow\text{6)-}\beta\text{-D-glucopiranosideo}$ (**10**)- tabela (Picerno et al., 2008).

O extrato aquoso do caule e folhas da *Mappia foetida* é usado na medicina folclórica para o tratamento de uma variedade de doenças que acometem as tribos indígenas, possuem propriedades anticâncerigenas e anti-bacteriana (Kumar et al., 2002). As sementes da *M. foetida* é uma rica fonte de óleo (35.0%), desta planta foi isolado o ácido 3-ceto-octadec-*cis*-15-enoico (11) (Hosamani & Pattanashettar, 2005). Esta espécie é também conhecida como *Nothapodytes foetida*, possui propriedade anticâncerigena devido a presença dos alcalóides camptotecina (46) e 9-methoxycamptotecina (47) presentes em suas partes aéreas e sementes (Fulzele & Satdive, 2005).

Heisteria é um gênero de árvores pequenas principalmente encontradas na América Tropical e África Ocidental. A *Heisteria nitida* tem sido utilizada na medicina tradicional no tratamento da diarreia e da infecção hepática. Diversas espécies do gênero *Heisteria* são utilizadas pelos índios sul-americanos no tratamento de reumatismo, abscessos, dor de cabeça, infecções na garganta, edemas, hemorragias nasais, dor nas articulações e nos músculos (El-Seedi et al., 2005).

Das cascas do caule da *Heisteria nítida*, foram isolados os alcalóides integerrenina (12), anorldianina 27-N óxido (13) e anorldianina (14) (El-Seedi et al., 2005), da fração em hexano foram isolados o stigmasterol (29), β -sitosterol (30) e lupeol (31) e da fração em acetato de etila foram obtidos a (+)-catequina (32), (-)-epicatequina (33) e ácido 4-hidroxi-3-metoxi-benzoico (34) (El-Seedi et al., 1999).

Das cascas do caule da *Heisteria acuminata*, foram isolados cinco compostos acetilênicos lineares denominados, ácido pentadeca-6,8,10-trinóico (35), ácido octadeca-8,10,12-trinóico (36), ácido *trans*-pentadeca-10-en-6,8-dinóico (37), ácido *cis*-hexadeca-11-en-7,9-dinóico (38) e ácido *cis*-octadeca-12-en-7,9-dinóico (39) (Kraus et al., 1998).

A *Ongokea gore* é uma árvore encontrada nas florestas da África Ocidental e Central, medindo até 30 m de altura. A decocção da casca do caule é utilizada como um laxante e a seiva da casca do caule usada no tratamento de sangramentos. Do extrato em metanol das raízes e cascas do caule da *O. gore*, foram isolados os protoflavanonas denominados (2S)-ongoqueina-4'-ona (**15**), (2S)-4',4'-dimetoxi-ongoqueina (**16**), (2S)-cis-4'-hidroxi-ongoqueina (**17**) e (2S)-trans-4'-hidroxi-ongoqueina (**18**) (Jerz et al., 2005).

A *Scorodocarpus borneensis* é uma árvore que cresce naturalmente na ilha de Bornéu e da Península Malaia, seus frutos têm um forte odor de alho e são utilizados como um condimento pelas populações locais (Lim et al., 1999). Dos frutos da *S. borneensis*, coletados na Malásia, foram isolados o sesquiterpeno escodopina (**19**), a mistura de três tipos de alcalóides triptamina denominados escorodocarpinas A–C (**20**, **21** e **22**), dois aminoácidos (R)-3-[(metiltio)metilsulfinil]-L-alanina (**23**), (S)-[(metiltio)metil]-L-cisteína (**24**) e três compostos com enxofre 2,4,5,7-tetratiaoctano 4,4-dióxido (**25**), 5-tioxo-2,4,6-tritiaheptano 2,2-dióxido (**26**), O-etil-S-metiltiometil tiosulfito (**27**) (Wiart et al., 2001; Kubota et al., 1998; Lim et al., 1999). Já das cascas do caule foi isolado o sesquiterpeno ácido cadalene- β -carboxílico (**28**) (Wiart et al., 2001).

A *Dulacia guianensis*, é uma árvore pouco comum no Brasil, esta amostra foi obtida a partir de uma árvore na floresta em Gallion numa localização 20 km do mar ao sul de Cayenne. Das cascas das raízes da *D. guianensis* foi isolado o sesquiterpeno manicol (**40**) (Banwell & Cameron, 1996). O extrato, em hexano, do caule da *Schoepfia californica* foi isolamento do ácido 9-octadecinoico (**41**) (Berry et al., 1991).

Ptychopetalum olacoides, é uma planta medicinal nativa da Amazônia Brasileira. As raízes e cascas da *P. olacoides*, conhecida como "Marapuama ou Muirapuama", são utilizadas na

medicina popular para o tratamento das condições crônicas degenerativas do sistema nervoso, como afrodisíaco e moderador do apetite (Tang et al., 2008, Siqueira et al., 2004). Recentemente, os extratos etanólicos de suas raízes apresentaram propriedade antidepressiva (Piato et al., 2008), atividade antioxidante (Siqueira et al., 2007) e atividade anticolinesterase (Siqueira et al., 2003). Do extrato em metanol das cascas do caule foram isolados quatro diterpenos: pticonolida (**42**), 20-*O*-metilpticonal acetal (**43**) e a mistura de pticonal hemiacetal (**44**) e pticonal (**45**) (Tang et al., 2008).

O gênero *Ximenia* é nomeado por um monge espanhol, Francisco Ximenez, que escreveu sobre as plantas do México no século 17. Este gênero também ocorre na América daí a origem do nome da espécie *X. americana*, que também ocorre no sul da África. As espécies *caffra* possuem nome que remete para Kaffraria, um nome antigo para uma parte do Cabo Oriental. A *Ximenia caffra* é encontrada em florestas e pastagens rochosas, ocorre da Tanzânia, do norte e do sul, e na África do Sul (Fabry et al., 1998). As raízes da *X. caffra* são usadas para o tratamento da disenteria, de inflamações e da cólera. O extrato em metanol das cascas do caule desta planta contém taninos e no extrato aquoso foi detectada a presença de cumarinas, que apresentaram atividade contra *Staphylococcus aureus*, *Enterococci* e *Pseudomonas aeruginosa* (Mathabe et al., 2006; Fabry et al., 1998).

Os extratos aquoso e etanólico do caule de *Olax subcorpioidea*, apresentaram atividade antimicrobiana (fungos e bactérias). Pode ser um arbusto ou árvore, podendo chegar até 10 m e amplamente distribuída na Nigéria, Senegal, Zaire e parte da África. Em análise de prospecção fitoquímica, o extrato etanólico do caule desta planta revelou a presença de alcalóides, esteróides, flavonóides e o extrato aquoso apresentou apenas saponinas (Ayandele & Adebisi, 2007).

Fitoquímica e propriedades biológicas da espécie *Ximenia americana* L.

A *X. americana* (**Figura 02.**), é conhecida popularmente como, ambuy (Minas Gerais), ameixa-da-baia, ameixa-da-terra, ameixa-de-espinho, ameixa-do-brasil (Ceará), ameixa-do-pará, espinheiro-de-ameixa, limão-bravo-do-brejo, sândalo-do-brasil, umbu-bravo e limão-bravo (Braga, 1960). Na medicina tradicional brasileira é utilizada popularmente como, aromática, adstringente, hemorroidal, diurética, depurativa, catártica, contra menstruação excessiva e perturbação gástrica (Braga, 1960).

No Oeste da África, o tronco pulverizado é aplicado para cura de feridas, a decocção das folhas é usada como laxante e no tratamento da tosse, os frutos são utilizados como anti-helmíntico e a maceração das raízes é utilizada para tratar a hanseníase (Maikai et al., 2008; Magassouba et al., 2007).

O extrato bruto da raiz mostrou uma atividade anti-bacteriana contra *Staphylococcus aureus* (Maiga et al., 2005; Omer & Elnima, 2003). Extratos preparados como infusão e decocção exibem atividade antimalarial contra as cepas cloroquina-sensível e cloroquinina-resistente de *Plasmodium falciparum* (Benoit-Vical et al., 1996), atividade antineoplásica e ação anti-inflamatória (Ogunleye & Ibitoye, 2003). O extrato aquoso e em metanol das cascas do caule apresentaram atividade antitripanosomal (Maikai et al., 2008) e as cascas do caule de *X. americana*, exibiu atividade antiviral contra o vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1) e tipo 2 (HIV-2) (Asres et al., 2001).

Através da análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM) dos óleos essenciais das folhas da *X. americana*, identificou-se uma mistura complexa de 33 constituintes, representando cerca de 98% do total do óleo. Este óleo é formado por 69% de compostos aromáticos, 12,5% de compostos lipídicos e 13% constituintes de terpenos, sendo o benzaldeído (**71**) o composto dominante com 63,5% (Mevy et al., 2006).

O óleo das sementes da *X. americana* L. foi submetido a estudo em CG-EM o que levou a identificação de 10 ácidos graxos, com um percentual de 92,42% de ácidos graxos insaturados, destacando-se o ácido oléico (**50**) (72,09%) como composto predominante, a presença dos ácidos graxos essenciais linoléico (**51**) (1.34%), linolênico (**52**) (10.31%) e araquidônico (**53**) (0.60%) com consideráveis valores nutricionais (Eromosele & Eromosele, 2002; Fatope et al., 2000) e o ácido ximênico (**54**) (Rezanka & Sigler, 2007).

Do caule e folhas, foram extraídos os compostos: ácido gálico (**48**) e 3-O-galloilepicatequina (**49**) (Mwangi et al., 1994), já das raízes da *X. americana* foram extraídas por maceração com clorofórmio, o estudo fitoquímico deste extrato resultou no isolamento dos ácidos octadeca-5-noíco (ácido tárco) (**55**) e ácido 10Z,14E,16E-octadeca-10,14,16-trieno-12-nóico (**56**) (Fatope et al., 2000).

Do extrato em hexano das cascas do caule da *X. americana* foram isolados os dois esteróides: estigmasterol (**57**) e 3-O-(β -D-glicopiranoil) sitosterol (**30**), cinco triterpenóides pentacíclicos: ácido betulínico (**59**), ácido oleanólico (**60**), 28-O-(β -D-glucopyranosil) ácido oleanólico (**61**), ácido 3-oxo-oleanólico (**62**) e ácido 3 β -hidroxicicloart-24(E)-ene-26-óico (**63**), já no extrato hexano do caule foi isolado um furanosesquiterpeno (**64**) (De Araújo et al., 2008).

Fitoquímica e propriedades biológicas da família Cecropiaceae

A família Cecropiaceae ordem Urticales, superordem Urticanae compreende 6 gêneros e 170 espécies distribuídas nos trópicos (Oliveira *et al.*, 2005). As espécies do gênero denominado *Cecropia* são comuns em todo território brasileiro e nas regiões secas do nordeste poucas espécies podem ser encontradas. Do ponto de vista botânico, a *C. pachystachya* fazia parte da família Moraceae, mas foi temporariamente transferida da família Moraceae para a família

Urticaceae. Porém, pelo fato dela apresentar características de natureza tanto de Moraceae como de Urticaceae, foi introduzida numa família independente, a Cecropiaceae (Hadijah, et al., 2008).

No Brasil encontramos várias espécies do gênero *Cecropia* das quais destacam-se *C. concolor*, *C. palmata*, *C. purpurascens*, *C. sciadophylla*, e *C. ulei* na Amazônia e *C. glaziovii*, *C. hololeuca* e *C. pachystachya* no Sudeste do Brasil (Sposito & Santos, 2001).

Plantas do gênero *Cecropia* são tradicionalmente usados para o tratamento de bronquite, asma, hipertensão arterial, infecções pulmonares e ansiedade. As folhas de *Cecropia hololeuca* são utilizadas para o tratamento da asma e da hipertensão arterial, a *Cecropia catharinenses* tem as mesmas propriedades e também é usada como diurética e existem relatos do uso etnofarmacológico da *Cecropia glazioui* como anti-hipertensiva, cardiotônica e agente anti-asmático (Almeida et al., 2006).

A *Cecropia obtusifolia* é uma planta extensivamente utilizada na medicina tradicional do México para o tratamento do diabetes do tipo-2, por possuir supostas propriedades hipoglicemiantes devido à presença do ácido corogênico (72) e isoorientina (73), compostos usados com hipoglicemiantes (Alonso-Castro et al., 2008, Andrade-Cetto & Wiedenfeld, 2001), anestésicos e anti-inflamatórios (Revilla-Monsalve et al., 2007). Das folhas de *Cecropia catharinensis* foram isolados os flavanóides glicosilados vitexina (74), isovitexina (75), orientina (76) e isoorientina (73) (Machado et al., 2008).

As folhas da *Musanga cecropioides*, também conhecida como a Umbrella e largamente encontrada no continente Africano, são usadas na medicina popular com anti-hipertensiva e anti-diabetes e a casca do caule é utilizada com angiotensiva (Adeneye et al., 2007).

Segundo Adeneye et al., 2007, os extratos aquoso e em metanol das cascas do caule também apresentam atividade hipoglicemiante e anti-diabetes. Do extrato em metanol da casca do caule da *M. cecropioides* foram isolados os triterpenos pentacíclico seco no anel A, ácido

cecropiacico (94), ácido cecropiacico metilado (95), ácido musangico (96), ácido musangico metilado (97) e os triterpenos ácido oleanólico (60), ácido ursólico (98) e ácido tormentico (77) (Lontsi et al., 1989).

As saponinas isovitexina (75), vitexina (74), ácido colorogênico (72) extraídas do extrato aquoso das folhas exibiram potente efeito hipotensivo (Dondmo et al., 1996, Kamanyi et al., 1996) também isolados catequinas, procianidinas, triterpenos e da casca do caule foi isolado o ácido gálico (48) (Ayinde et al., 2006). Das raízes foram isolados triterpenos ácido 2 α ,11 α -diacetoxi-3 β ,19 α -dihidroxiurs-12-en-28-óico (87), tormentato de metila (82), metil-2-acetiltormentato (88), um derivado diacetilado do tormentato de metila (89) (Lontsi et al., 1998) e ácido musangico (93) (Lontsi et al., 1992).

A *Cecropia glaziovii*, é uma planta medicinal sul-americana, devido a presença flavonóides e proantocianidinas mostrados em prospecção fitoquímica e apresenta atividade anti-hipertensiva (Lima-Landman et al., 2007). As variações sazonais e intraespecíficas destas duas classes de compostos presentes nas folhas de *C. glaziovii* mostram diferença quando coletadas em período seco ou chuvoso, mas não são estatisticamente diferentes entre folhas jovens e maduras da mesma época (Luengas-Caicedo et al., 2007). A *Cecropia schreberiana* é uma árvore comum nas montanhas de Porto Rico, tem as mesma características do gênero a única diferença é que esta espécie não tem simbiose com formigas (Brokaw, 1998).

A espécie *Cecropia lyratiloba* destaca-se por apresentar ação anti-hipertensiva (Rocha et al., 2007). No entanto, as propriedades farmacológicas da *C. lyratiloba* são ainda pouco estudadas. Estudos fitoquímicos da fração diclorometano das raízes desta planta conduziram à identificação de quatro triterpenóides pentacíclicos: ácidos tormêntico (77), euscafico (78), 3-acetil tormentico (79), isoarjunolico (80), os quais possuem atividade antihipertensiva e vasodilatadora (Almeida et al., 2006; Oliveira et al., 2005).

Do extrato em acetato de etila da madeira da *Myrianthus serratus*, foram isolados os triterpenos pentacíclico γ -lactona no anel E (**81**) e os triterpeno pentacíclicos: tormentato de metila (**82**), euscafato de metila (**83**), bentamato de metila (**84**), metil- 2 α -hidroxioleanalato (**85**) e cecropato de metila (**86**) (Lontsi et al., 1998). Do extrato em metanol do caule da *Myrianthus liberecus*, foram isolados os triterpenos pentacíclico: metil arjunolato (**90**), metil 3-isoarjunolato (**91**) e metil 3 β -O-(4''-O-metil-E-coumaroil)-arjunolato (**92**) (Tapondjou et al., 1995).

Fitoquímica e propriedades biológicas da espécie *Cecropia pachystachya* Trec.

A *Cecropia pachystachya* (**Figura 04.**) é uma árvore ereta, de 5-15 metros de altura, com troncos e segmentos onde formigas do gênero *Azteca* vivem em metabiose. Em seus galhos e no caule aparecem os nós semelhantes como os do bambu. É originária da zona tropical do continente americano (Lorenzi, 1992, Nishi & Romero, 2008), e se distribui desde o México até Argentina, mas aparece em maior quantidade na região do Equador, ou seja, na região Amazônica (Batista et al., 2008, Lorenzi, 1992).

No Brasil, é conhecida como: ambaia-tinga, ambaiba, árvore-da-preguiça, bauna, bauva, embaíba, embaúba, imbaíba, imbaíba-branca, imbaúba-de-folha-branca, imbaíba-de-folha-grande, imbaíba-de-folha-prateada, imbaíba-do-mato, imbaúba-branca (Belém), imbaúva-torem, umbaíba, umbaíba-branca e umbaúba (Braga, 1960). É utilizada popularmente como: diurética, tônica, antihemorrágica, adstringente, antiasmática, antitussígena, antigonorréica, antileucorreia e para o tratamento de coqueluche, afecção respiratória, taquicardia, bronquite, pressão alta, tuberculose, e para o tratamento cardio-pulmonar, cardio-renal e curativos das feridas (Consolini et al., 2006; Braga, 1960).

As frações em clorofórmio e acetato de etila das folhas, mostraram ação antioxidante com IC₅₀ de 5,9 e 3,9 respectivamente (Velásquez et al., 2003), já o extrato aquoso apresenta efeito cardiotônico (Consolini et al., 2006), atividade cardiovascular e antihipertensiva (Consolini & Migliori, 2005).

Os extratos em metanol da casca do tronco apresentam atividade alelopática contra o *Panicum maximum* (capim-massai). Os seguintes constituintes voláteis foram identificados por CG-EM: geranilacetona (**100**), ácido láurico (**101**), ácido palmítico (**102**), octadecanal (**103**) e alcenos de cadeia longa na casca; geranilacetona (**100**), farnesol (**104**), farnesilacetona (**105**), octadecanal (**103**), ácido palmítico (**102**) e alcenos de cadeia longa na raiz e geranilacetona (**100**), ácido palmítico (**102**) e alcenos de cadeia longa na madeira (Hernandez-Terrones et al., 2007).

Do extrato em diclorometano das folhas da *C. pachystachya* foi isolado o ácido pomólico (**99**) que mostrou atividade anti-inflamatória e apoptótica (Schinella et al., 2008). Dos extratos em hexano, tetracloreto de carbono e clorofórmio das folhas e cascas do caule foram isolados o β - sitosterol (**30**), α -amirina (**69**), ácido ursólico (**91**), ácido oleanólico (**61**) e o ácido pomolico (**99**) (Hikawczuk et al., 1998),

CONCLUSÃO

O uso medicinal das plantas pertencentes às famílias Cecropiaceae e Olacaceae pela população de diferentes partes do mundo tem encontrado respaldo nos estudos científicos, que comprovam a eficácia destas plantas em vários modelos experimentais. Neste contexto, alguns efeitos biológicos ou farmacológicos, como antihipertensivo, antibacteriano, analgésico, anti-inflamatório e especialmente antidiabético, são relatados na literatura, comprovando e justificando o uso destas espécies na medicina popular.

As espécies *Cecropia pachystachya* (Cecropiaceae) e *Ximenia americana* (Olacaceae), são plantas utilizadas na medicina popular para cura de enfermidades e possuem atividade biológica e farmacológica funcionando como anti-inflamatória, antiplasmodial, cardiotônica etc, mas estas plantas necessitam de uma maior análise fitoquímica, pois existem poucos relatos de constituintes químicos isolados e descritos na literatura.

Embora muitos compostos, incluindo alcalóides, terpenos, esteróides, flavonóides etc, tenham sido isolados e identificados nas espécies destas famílias, são raros os estudos que relacionam tais compostos aos efeitos biológicos indicados. Cabe ressaltar, por exemplo, que a maioria dos compostos ativos como antihiperlipidêmicos continuam obscuros e a descoberta destas substâncias poderia levar à obtenção de novos fitofármacos ou mesmo fármacos para o tratamento de diabetes do tipo II, patologia que aflige um grande número de pessoas em todo o mundo.

REFERÊNCIAS:

Adeneye AA, Ajagbonna OP, Ayodele OW 2007. Hypoglycemic and antidiabetic activities on the stem bark aqueous and ethanol extracts of *Musanga cecropioides* in normal and alloxan-induced diabetic rats. *Fitoterapia* 78: 502–505.

Alonso-Castro AJ, Miranda-Torres AC, González-Chávez MM, Salazar-Olivo LA 2008. *Cecropia obtusifolia* Bertol and its active compound, chlorogenic acid, stimulate 2-NBDglucose uptake in both insulin-sensitive and insulin-resistant 3T3 adipocytes. *J Ethnopharmacol* 120: 458–464.

Almeida RR, Raimundo JM, Oliveira RR, Kaplan MAC, Gattass CR, Sud RT, Zapata-Sudo G 2006. Activity of *Cecropia lyratiloba* extract on contractility of cardiac and smooth muscles in wistar rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 33: 109 –113.

Andrade-Cetto A, Wiedenfeld H 2001. Hypoglycemic effect of *Cecropia obtusifolia* on streptozotocin diabetic rats. *J Ethnopharmacol.* 78: 145-149.

Asres K, Bucar F, Kartnig T, Witvrouw M, Pannecouque C, De Clercq E 2001. Antiviral activity against human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and type 2 (HIV-2) of ethnobotanically selected ethiopian medicinal plants. *Phytother. Res.* 15: 62-69.

Ayandele AA, Adebisi AO 2007. The phytochemical analysis and antimicrobial screening of extracts of *Olax subscorpioidea*. *Afr J Biotechnol.* 6: 868-870.

Ayinde BA, Onwukaeme DN, Nworgu ZAM 2006. Oxytocic effects of the water extract of *Musanga cecropioides* R. Brown (Moraceae) stem bark. *Afr J Biotechnol* 5: 1350-1354.

Banwell MG, Cameron JM 1996. Enantiospecific construction of the carbon skeleton associated with manicol, an antineoplastic sesquiterpene from *Dulacia guianensis* (Olacaceae). *Tetrahedron Lett.* 37: 525-526.

Batista CUN, Medri ME, Bianchini E, Medri C, Pimenta JA 2008. Tolerância à inundação de *Cecropia pachystachya* Trec. (Cecropiaceae): aspectos ecofisiológicos e morfoanatômicos. *Acta Bot Bras* 22: 91-98.

Benoit F, Valentin A, Pelisier Y, Diafouka F, Marion C, Kone-Bamba D, Mallie M, Yapo A, Bastide JM 1996. *In vitro* antimalarial activity of vegetal extracts used in West African traditional medicine. *Am J Trop Med Hyg* 54: 67–71.

Berg CC 1996. *Cecropia* (Cecropiaceae) no Brasil, ao sul da Bacia Amazônica. *Albertoa* 4: 218-219.

Berry DE, Chan JA, Mackenzie L, Hecht SM 1991. 9-Octadecynoic Acid: A Novel DNA binding agent. *Chem. Res. Toxicol.* 4: 195-198.

Braga, R 1960. *Plantas do Nordeste Especialmente do Ceará*. 4ª Ed. Editora Universitária – UFRN, Natal – RN.

Brokaw NVL 1998. *Cecropia schreberiana* in the luquillo mountains of Puerto Rico. *Bot Rev* 64: 91-120.

Carauta JPP 1993. Moraceae da reserva florestal estadual da vista chinesa, Rio de Janeiro. *Albertoa* 4: 213-215.

Carvajal S, González–Villarreal LM 2005. *La familia Cecropiaceae en el estado de Jalisco*, México. 1ª ed. Editora Universidade de Guadalajara, Jalisco – México.

Consolini AE, Ragone MI, Migliori GN, Conforti P, Volonté MG 2006. Cardiotonic and sedative effects of *Cecropia pachystachya* Mart. (ambay) on isolated rat hearts and conscious mice. *J Ethnopharmacol* 106: 90–96.

Consolini AE, Migliori GN 2005. Cardiovascular effects of the South American medicinal plant *Cecropia pachystachya* (ambay) on rats. *J Ethnopharmacol* 96: 417–422

Cursino LMC, Mesquita ASS, Mesquita DWO, Fernandes CC, Pereira Junior OL, Amaral IL, Nunez CV 2009. Triterpenos das folhas de *Minquartia guianensis* Aubl. (Olacaceae). *Acta Amazonica* 39: 181-186.

De Araújo MRS, Assunção JCC, Dantas INF, Costa-Lotufo LV, Monte FJQ 2008. Chemical constituents of *Ximenia americana*. *Nat Prod Commun* 3: 857-860.

Dongmo AB, Kamanyi A, Bopelet M 1996. Saponins from the leaves of *Musanga cecropioides* (Cecropiaceae) constitute a possible source of potent hypotensive principles. *Phytother Res* 10: 23-27.

El-Seedi HS, Larsson S, Backlund A 2005. Chemosystematic value of cyclopeptide alkaloids from *Heisteria nitida* (Olacaceae). *Biochem Systemat Ecol* 33: 831-839.

El-Seedi HR, Gohil S, Perera P, Torssell KBG, Bohlin L 1999. Cyclopeptide alkaloids from *Heisteria nitida*. *Phytochem* 52: 1739-1744.

El-Seedi HR, Hazell AC, Torssell KBG 1994. Triterpenes, lichexanthone and an acetylenic acid from *Minquartia guianensis*. *Phytochem* 35: 1297-1299.

Eromosele CO, Eromosele IC 2002. Fatty acid compositions of seed oils of *Haematostaphis barteri* and *Ximenia americana*. *Bioresour Technol* 82: 303–304.

Fabry W, Okemo PP, Ansorg R 1998. Antibacterial activity of East African medicinal plants. *J Ethnopharmacol* 60: 79–84.

Fatope MO, Adoum OA, Takeda Y 2000. C18 acetylenic fatty acids of *Ximenia americana* with potential pesticidal activity. *J Agric Food Chem* 48: 1872-1874.

Fatope MO, Adoum OA, Takeda Y 2000. Oleanene palmitate from *Ximenia americana*. *Pharm Biol* 38: 391-393.

Fort DM, King SR, Carlson TJ, Nelson ST 2000. Minquartynoic acid from *Coula edulis*. *Biochem Systemat Ecol* 28: 489-490.

Fulzele DP, Satdive RK 2005. Distribution of anticancer drug camptothecin in *Nothapodytes foetida*. *Fitoterapia* 76: 643– 648.

Gandolfi S 2000. *História natural de uma floresta estacional semidecidual no município de Campinas* (São Paulo, Brasil). Ph.D. Thesis, Universidade Estadual de Campinas, p. 100.

Hadijah JT, Conn BJ, Quinn CJ 2008. Infra-familial phylogeny of Urticaceae, using chloroplast sequence data. *Aust Systemat Bot* 21: 375-385.

Haron NW, Pingt SN 1997. Distribution and taxonomic significance of flavonoids in the Olacaceae and Icacinaceae. *Biochem Systemat Ecol*, v. 25 (3), 263-265.

Hernandez-Terrones MG, Morais SAL, Londe GB, Nascimento EA, Chang R 2007. Allelopathic action of *Cecropia pachystachya* extracts on the growth of guinea grass of (*Panicum maximum*). *Planta Daninha* 25: 763-769.

Hikawezuk VJ, Saad JR, Guardia T, Juarez AO, Giordano OS 1998. Anti-inflammatory activity of compounds isolated from *Cecropia pachystachya*. *Anales de la Asociacion Química Argentina* 86:167-170.

Hosamani KM, Pattanashettar RS 2005. *Mappia foetida* seed oil: A rich source of oil and moderate source of novel 3-keto-octadec-cis-15-enoic acid and its possible industrial utilization. *Ind Crops Prod* 22: 135–139.

Ito A, Cui B, Chávez B, Chai HB, Shin YG, Kawanishi K, Kardono LBS, Riswan S, Farnsworth NR, Cordell GA, Pezzuto JM, Kinghorn AD 2001. Cytotoxic polyacetylenes from the twigs of *Ochanostachys amentacea*. *J Nat Prod* 64: 246-248.

Jayasuriya H, Herath KB, Ondeyka JG, Guan Z, Borris RP, Tiwari S, Jong W, Chavez F, Moss J, Stevenson DW, Beck HT, Slattery M, Zamora N, Schulman M, Ali A, Sharma N, MacNaul K,

Hayes N, Menke JG, Singh SB 2005. Diterpenoid, steroid, and triterpenoid agonists of liver x receptors from diversified terrestrial plants and marine sources. *J Nat Prod* 68: 1247-1252.

Jerz G, Waibel R, Achenbach H 2005. Cyclohexanoid protoflavanones from the stem-bark and roots of *Ongokea gore*. *Phytochem* 66, 1698–1706.

Kamanyi A, Bopelet M, Lontsi D, Noamesi BK 1996. Hypotensive effects of some extracts of the leaves of *Musanga cecropioides* (Cecropiaceae). Studies in the cat and the rat: *Phytomedicine* 2: 209-212.

Kraus CM, Neszmélyi A, Holly S, Wiedemann B, Nenninger A, Torssell KBG, Bohlin L, Wagner H 1998. New acetylenes isolated from the bark of *Heisteria acuminata*. *J Nat Prod* 61: 422-427.

Kubota K, Hirayama H, Sato Y, Kobayashi A, Sugawara F 1998. Amino acid precursors of the garlic-like odour in *Scorodocarpus borneensis*. *Phytochem* 48: 99-102.

Kumar RM, Vishwanathan H, Suresh T, Mohan PS 2002. Antibacterial activity of *Mappia foetida* leaves and stem. *Fitoterapia* 73: 734–736.

Lim H, Kubota K, Akio K, Sugawara F 1998. Sulfur-containing compounds from *Scorodocarpus Borneensis* and their antimicrobial activity. *Phytochem* 49: 787-790.

Lim H, Kubota K, Akio K, Seki T, Ariga T. 1999. Inhibitory effect of Sulfur-containing compounds from *Scorodocarpus Borneensis* Becc. On the aggregation of rabbit platelets. *Biosc. Biotechnol. Biochem.*, 63: 298-301.

Lima-Landman MTR, Borges ACR, Cysneiros RM, De Lima TCM, Souccar C, Lapa AJ, Antihypertensive effect of a standardized aqueous extract of *Cecropia glaziovii* Sneth in rats: An in vivo approach to the hypotensive mechanism. *Phytomedicine* 14: 314-320.

Lontsi D, Sondengam BL, Martin MT, Bodo B 1998. Cecropioic acid, a pentacyclic triterpene from *Musanga cecropioides*. *Phytochem* 48: 171-174.

Lontsi D, Sondengam BL, Martin MT, Bodo B 1992. Musangicic acid, a triterpenoid constituent of *Musanga cecropioides*. *Phytochem* 31: 4285-4288.

Lontsi D, Sondengam BL, Martin MT, Bodo B 1991. Musancropic acid-A and musancropic acid-B - A-ring contracted triterpenes from *Musanga cecropioides*. *Phytochem* 30: 2361-2364.

Lontsi D, Sondengam BL, Ayafor JF 1989. Chemical studies on the cecropiaceae: a novel a-ring Seco triterpene from *Musanga cecropioides*. *J Nat Prod* 52: 52-56.

Lorenzi H 1992. *Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. Nova Odessa, Ed. Plantarum.

Luengas-Caicedo PE, Braga FC, Brandão GC, De Oliveira AB 2007. Seasonal and intraspecific variation of flavonoids and proanthocyanidins in *Cecropia glaziovii* sneth. leaves from native and cultivated specimens. *J Biosc* 62: 701-709.

Machado EC, Yunes RA, Malheiros A, Gomez EC, Delle Monache F 2008. Two new 11 alpha,12 alpha-epoxy-ursan-28,13 beta-olides and other triterpenes from *Cecropia catharinensis*. *Nat Prod Resear* 22: 1310-1316.

Magassouba FB, Diallo A, Kouyaté M, Mara F, Mara O, Bangoura O, Camara A, Traoré S, Diallo AK, Zaoro M, Lamah K, Diallo S, Camara G, Traoré S, Kéita A, Camara MK, Barry R, Kéita S, Oularé K, Barry MS, Donzo M, Câmara K, Toté K, Vanden-Berghe D, Totté J, Pieters L, Vlietinck AJ, Balde A M 2007. Ethnobotanical survey and antibacterial activity of some plants used in Guinean traditional medicine. *J Ethnopharmacol* 114: 44–53.

Maiga A, Diallo D, Fane S, Sanogo R, Paulsen BS, Cisse B 2005. A survey of toxic plants on the market in the district of Bamako, Mali: traditional knowledge compared with a literature search of modern pharmacology and toxicology. *J Ethnopharmacol* 96: 183–193.

Maikai VA, Kobo PI, Adaudi AO 2008. Acute toxicity studies of aqueous stem bark extract of *Ximenia americana*. *Afr J Biotechnol* 7: 1600-1603.

Maikai VA, Nok JA, Adaudi AO, Alawa CBI 2008. *In vitro* antitrypanosomal activity of aqueous and methanolic crude extracts of stem bark of *Ximenia americana* on *Trypanosoma congolense*. *J Med Plants Resear* 2: 55-58.

Mathabe MC, Nikolova RV, Lall N, Nyazema NZ 2006. Antibacterial activities of medicinal plants used for the treatment of diarrhoea in Limpopo Province, South África. *J Ethnopharmacol* 105: 286–293.

Matos FJA 2007. *Plantas medicinais: guia de seleção e emprego das plantas usadas em fitoterapia no Nordeste Brasileiro*. Fortaleza: Imprensa Universitária. 122-124.

Mevy JP, Bessiere JM, Greff S, Zombre G, Viano J 2006. Composition of the volatile oil from the leaves of *Ximenia americana* L. *Biochem Systemat Ecol* 34, 549-553.

Mwangi JW, Malii P, Gathu L, Tanaka T, Nonaka G 1994. Polyphenols of *Ximenia americana* var. *caffra*. *Fitoterapia*: 65, 185.

Nishi AH, Romero GQ 2008. Colonization pattern of *Cecropia* by *Azteca* ants: Influence of plant ontogeny, environment and host plant choice by queens. *Sociobiol* 52: 367-376.

Ogunleye DS, Ibitoye SF 2003. Studies of antimicrobial activity and chemical constituents of *Ximenia americana*. *Trop J Pharmaceut Resear* 2: 239-241.

Oliveira RR, Leitão GG, Moraes MCC, Kaplan MAC, Lopes D, Carauta JPP 2005. Gradient elution for triterpene separation from *Cecropia lyratiloba* Miquel by HSCCC. *J Liq Chromatogr Relat Technol* 28: 1985-1992.

Omer MEFA, Elnima EI 2003. Antimicrobial activity of *Ximenia americana*. *Fitoterapia*: 74, 122–126.

Piato AL, Detanico BC, Jesus JF, Lhullier FLR, Nunes DS, Elisabetsky E 2008. Effects of marapuama in the chronic mild stress model: further indication of antidepressant properties. *J Ethnopharmacol* 118: 300–304.

Picerno P, Mencherini T, Rastrelli L, Piccinelli A, Aquino R 2008. Isoprenoid glycosides from *Liriosma ovata*. *J Nat Prod* 71: 265–268.

Revilla-Monsalve MC, Andrade-Cetto A, Palomino-Garibay MA, Wiedenfeld H, Islas-Andrade S 2007. Hypoglycemic effect of *Cecropia obtusifolia* Bertol aqueous extracts on type 2 diabetic patients. *J Ethnopharmacol* 111: 636–640.

Rezanka T, Sigler K 2007. Identification of very long chain unsaturated fatty acids from *Ximenia* oil by atmospheric pressure chemical ionization liquid chromatography–mass spectroscopy. *Phytochem* 68: 925–934.

Rocha GG, Simões M, Lúcio KA, Oliveira RR, Kaplanb MAC, Gattassa CR 2007. Natural triterpenoids from *Cecropia lyratiloba* are cytotoxic to both sensitive and multidrug resistant leukemia cell lines. *Bioorg Med Chem* 15: 7355 – 7360.

Sabitha G, Reddy CS, Yadav JS 2006. Total syntheses of the highly potent anti-cancer polyacetylenes, (S)-18-hydroxyminquartynoic acid, (S)-minquartynoic acid and (E)-15,16-dihydrominquartynoic acid. *Tetrahedron Lett* 47: 4513–4516.

Schinella G, Aquila S, Dade M, Giner R, Recio MC, Spegazzini E, De Buschiazzi P, Tournier H, Rios JL 2008. Anti-inflammatory and apoptotic activities of pomolic acid isolated from *Cecropia pachystachya*. *Planta Med* 74: 215-220.

Siqueira IR, Fochesatto C, Torres ILS, Da Silva AL, Nunes DS, Elisabetsky E, Netto CA 2007. Antioxidant activities of *Ptychopetalum olacoides* ("muirapuama") in mice brain. *Phytomedicine* 14: 763-769.

Siqueira IR, Cimarosti H, Fochesatto C, Nunes DS, Salbego C, Elisabetsky E, Netto CA 2004. Neuroprotective effects of *Ptychopetalum olacoides* Benth (Olacaceae) on oxygen and glucose deprivation induced damage in rat hippocampal slices. *Life Sci* 75: 1897–1906.

Siqueira IR, Fochesatto C, Da Silva AL, Nunes DS, Battastini AM, Netto CA, Elisabetsky E 2003. *Ptychopetalum olacoides*, a traditional Amazonian “nerve tonic”, possesses anticholinesterase activity. *Pharmacol, Biochem Behav* 75: 645–650.

Souza VC, Lorenzi H 2005. *Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias Angiosperma da flora brasileira, baseado em APG II*. Nova Odessa: Instituto Plantarum, p. 640.

Sposito TC, Santos FAM 2001. Scaling of stem and crown in eight *Cecropia* (Cecropiaceae) species of Brazil. *Am J Bot* 88: 939-949.

Tang W, Hioki H, Harada K, Kubo M, Fukuyama Y 2008. Clerodane diterpenoids with NGF-potentiating activity from *Ptychopetalum olacoides*. *J Nat Prod* 71: 1760-1763.

Tapondjou AL, Ngounou NF, Lontsi D, Sondengam BL, Martin MT, Bodo B 1995. Pentacyclic triterpenes From *Myrianthus-Liberecus*. *Phytochem* 40: 1761-1764.

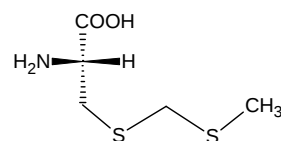
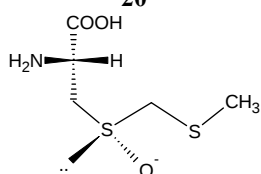
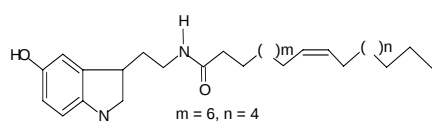
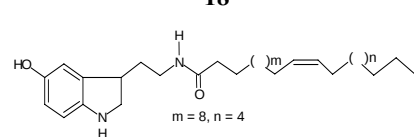
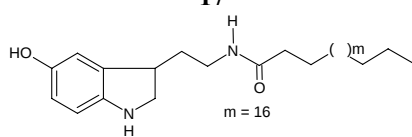
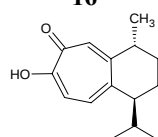
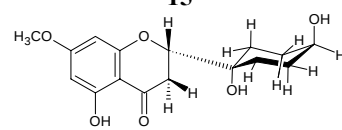
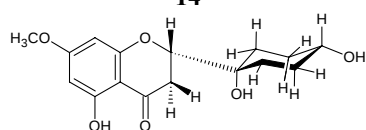
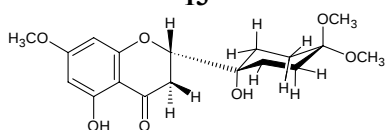
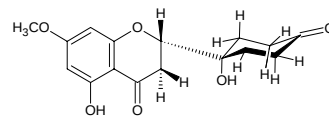
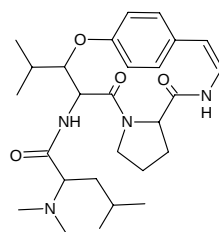
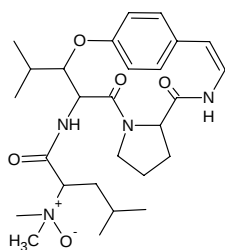
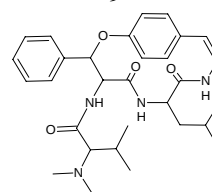
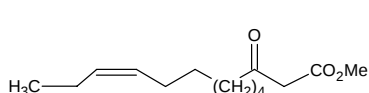
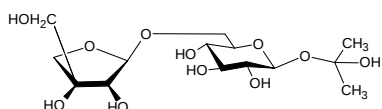
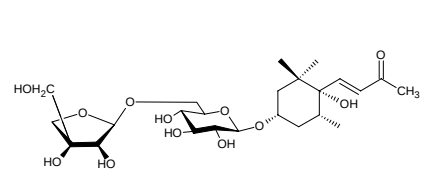
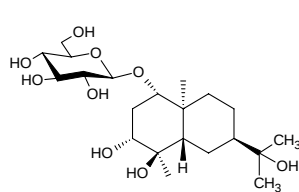
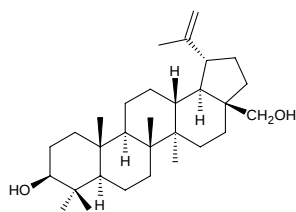
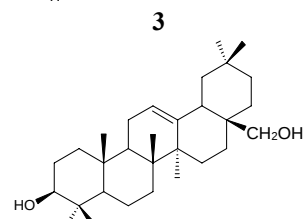
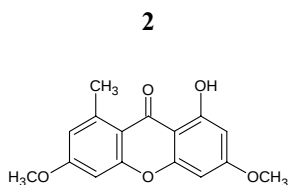
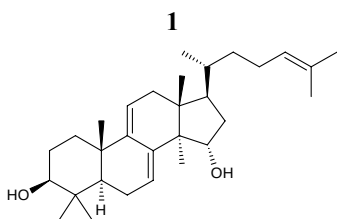
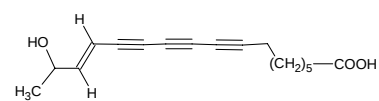
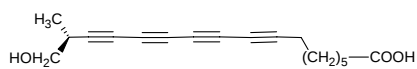
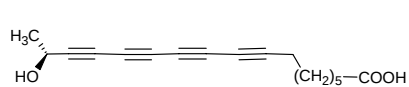
Tchiegang C, Kapseu C, Parmentier M 2007. Chemical composition of oil from *Coula edulis* (Bail.) Nuts. *J Food Lipids* 5: 103-111.

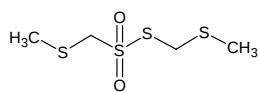
Thunfort PP, Pate JS, Rasins E, Ghisalberti EL 1993. S-Ethyl cysteine: an amino acid from *Olaex phyllanthi*. *Phytochem* 34: 657-659.

Velázquez E, Tournier HA, Buschiazzi PM, Saavedro G, Schinella GR 2003. Antioxidant activity of paraguayan plant extracts. *Fitoterapia* 74, 91-97.

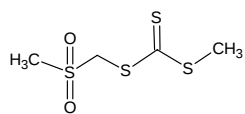
Wiat C, Martin MT, Awang K, Hue N, Serani L, Laprévote L, País M, Rhamani M 2001. Sesquiterpenes and alkaloids from *Scorodocarpus borneensis*. *Phytochem* 58: 653–656.

Figura 01. Constituintes químicos da família Olacaceae

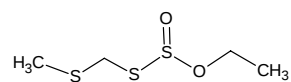




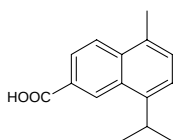
25



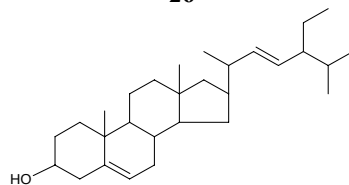
26



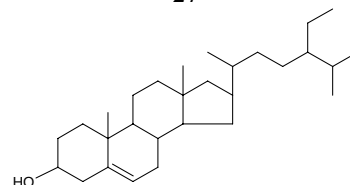
27



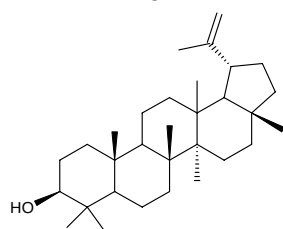
28



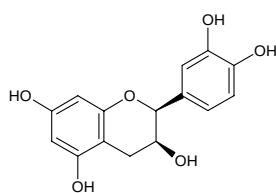
29



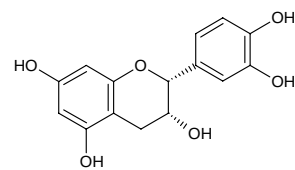
30



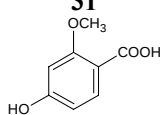
31



32



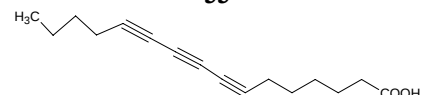
33



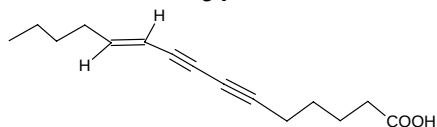
34



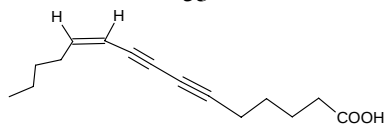
35



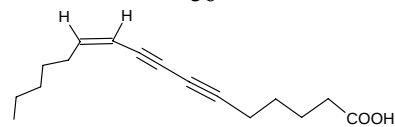
36



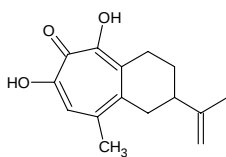
37



38



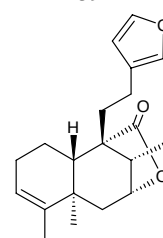
39



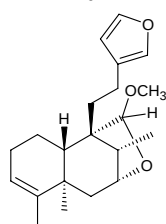
40



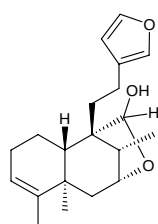
41



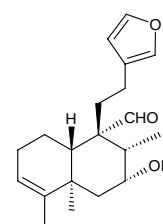
42



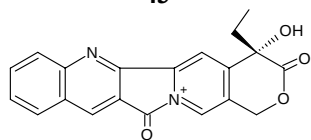
43



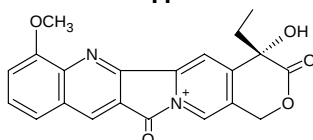
44



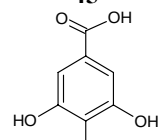
45



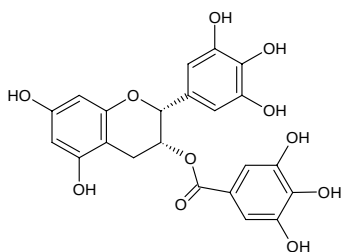
46



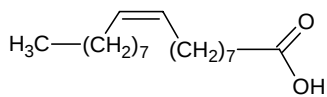
47



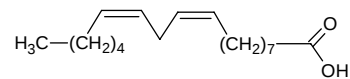
48



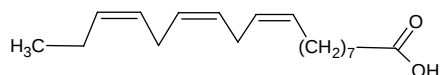
49



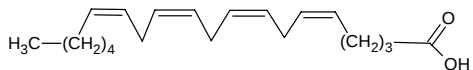
50



51



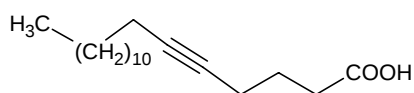
52



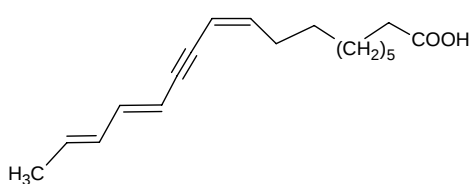
53



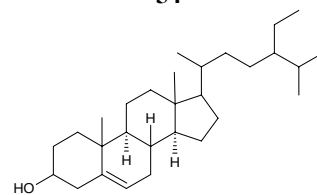
54



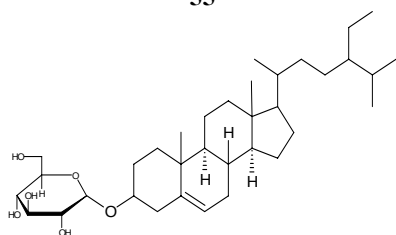
55



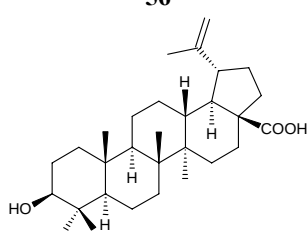
56



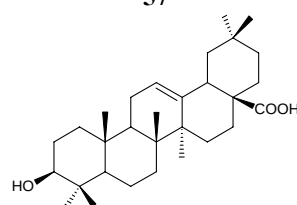
57



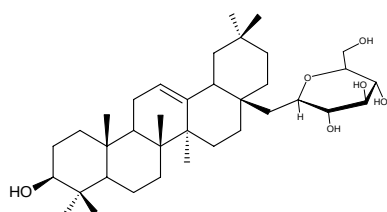
58



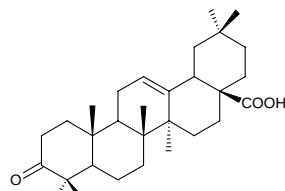
59



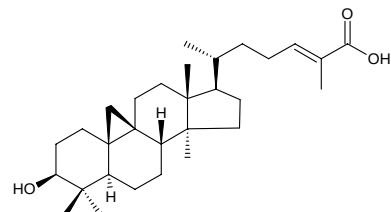
60



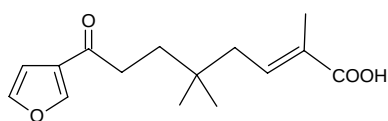
61



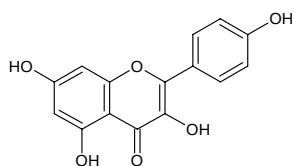
62



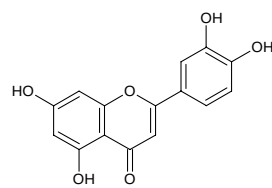
63



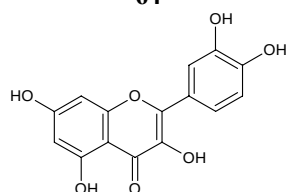
64



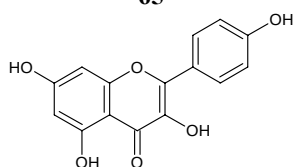
65



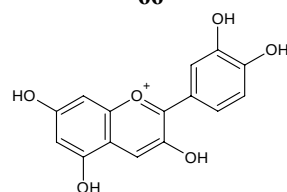
66



67



68



69

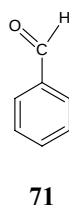
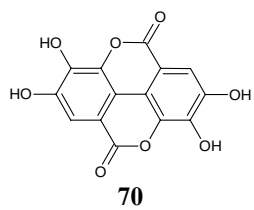
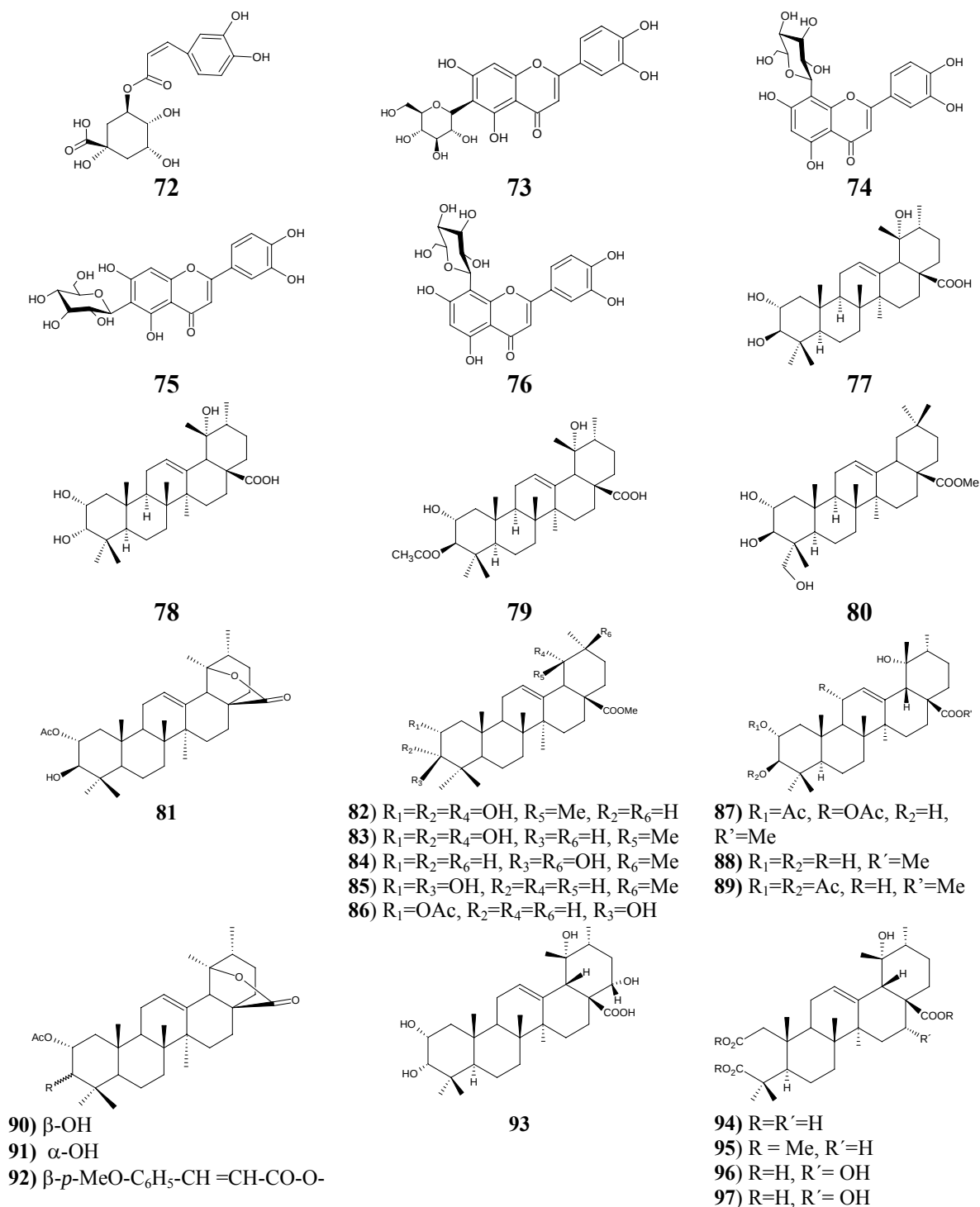


Figura 02. *Ximenia americana* L.



Figura 03. Compostos isolados da família Cecropiaceae



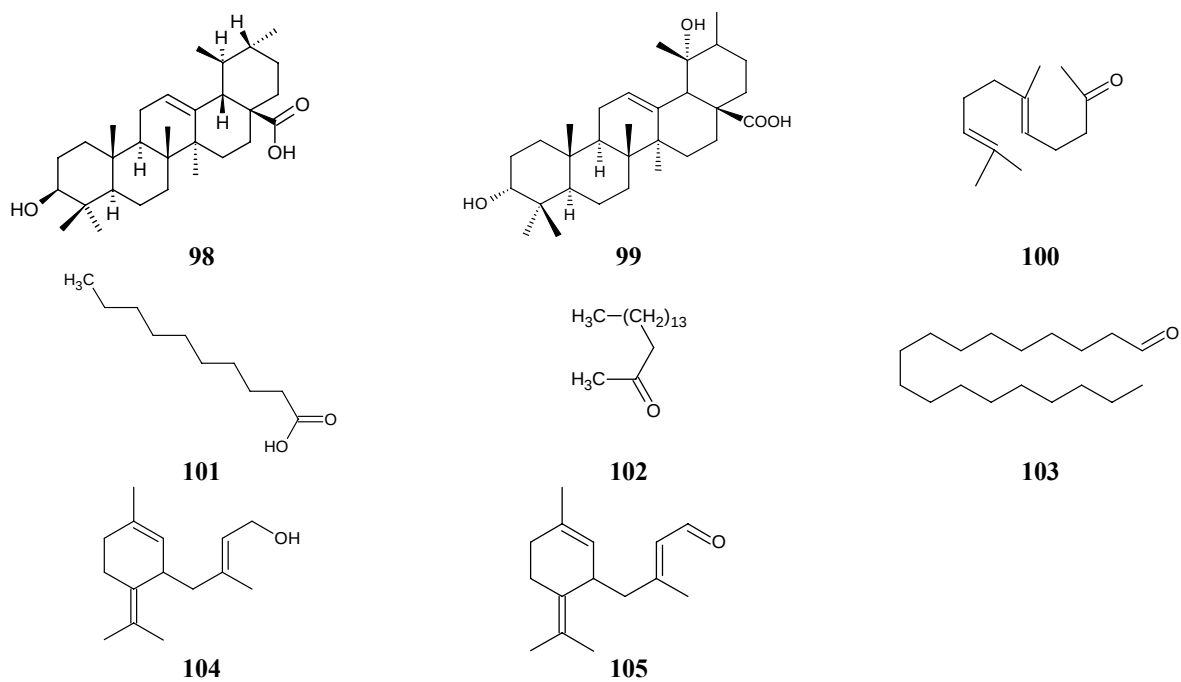


Figura 04 – *Cecropia pachystachya*



www.plantarum.com.br/embauva.html em 13/01/2009

Tabela 01. Atividades biológicas e constituintes químicos das famílias Cecropiaceae e Olacaceae

Familia	Espécies	Partes da Planta	Atividade Biológica	Compostos isolados	Referências
Cecropiaceae	<i>Cecropia catharinensis</i> Cuatrec.	Folhas	Antihipertensiva	66, 67, 68 e 69	Machado et al., 2008
Cecropiaceae	<i>Cecropia glaziovii</i> Sneth.	Folhas	Antihipertensiva	-	Lima-Landman et al., 2007
Cecropiaceae	<i>Cecropia lyratiloba</i> Miquel.	Raízes	Antihipertensiva e vasodilatadora	70, 71, 72 e 73	Almeida et al., 2006 Oliveira et al., 2005
Cecropiaceae	<i>Cecropia obtusifolia</i> Bertol.	Folhas	Anestésica e anti-inflamatória	65 e 66	Alonso-Castro et al., 2008, Andrade-Cetto & Wiedenfeld, 2001 Revilla-Monsalve et al., 2007
Cecropiaceae	<i>Cecropia pachystachya</i> Tréc.	Folhas	Antioxidante, cardiotônica, antihipertensiva e anti-inflamatória	30, 61, 69, 91 e 92	Velásquez et al., 2003 Consolini et al., 2006 (Consolini and Migliori, 2006 Schinella et al., 2008
Cecropiaceae	<i>Musanga cecropioides</i> R. Br.	Folhas e cascas do caule	Anti-hipertensiva, anti-diabetes e angiotensiva	60, 70, 87, 88, 89, 90 e 91	Adeneye et al., 2007 Lontsi et al., 1989
Cecropiaceae	<i>Myrianthus liberecus</i>	Caule	-	83, 84 e 85	Tapondjou et al., 1995
Cecropiaceae	<i>Myrianthus serratus</i> Trecul.	Madeira	-	74, 75, 76, 77, 78 e 79	Lontsi et al., 1998
Olacaceae	<i>Coula edulis</i> Bail.	Cascas do caule	Cicatrizante e anti-inflamatória	1	Fort et al., 2000
Olacaceae	<i>Dulacia guianensis</i> (Engl.) O. Ktze.	Cascas das raízes	-	40	Banwell & Cameron, 1996
Olacaceae	<i>Heisteria acuminata</i> (Humb. & Bonpl.)	Cascas do caule	Anti-inflamatória e antireumática	35, 36, 37, 38 e 39	Kraus et al., 1998
Olacaceae	<i>Heisteria nítida</i> Engl.	Cascas do caule	Anti-inflamatória	12, 13, 14, 29, 30, 31, 32, 33 e 34	El-Seedi et al., 2005
Olacaceae	<i>Liriosma ovata</i> Miers.	Cascas do caule	Antireumática, cardiotônica, doenças do sistema gastrointestinal	8, 9 e 10	Picerno et al., 2008
Olacaceae	<i>Minquartia guianensis</i> Aubl.	Cascas do caule	Anti-inflamatória e doenças do sistema gastrointestinal	1, 4, 5, 6, 7 e 31	El-Seedi et al., 1994 Fort et al., 2000 Jayasuriya et al., 2005 Cursino et al., 2009

Familia	Espécie	Parte da Planta	Atividade Biológica	Compostos isolados	Referência
Olacaceae	<i>Nothapodytes foetida</i> (syn; <i>Mappia foetida</i>)	Partes aéreas e sementes	Antibacteriana e anti-inflamatória	11, 46 e 47	Hosamani & Pattanashettar, 2005 Fulzele & Satdive, 2005 Kumar et al., 2002
Olacaceae	<i>Ochanostachys amentácea</i> Mast.	Galhos	Antipirética	1, 2 e 3	Sabitha et al., 2006 Ito et al., 2001
Olacaceae	<i>Olex subcorpioidea</i> Oliv.	Caule	Antimicrobiana		Ayandele & Adebisi, 2007
Olacaceae	<i>Ongokea gore</i> Engler.	Raízes e cascas do caule	Cicatrizante e laxante	15, 16, 17 e 18	Jerz et al., 2005
Olacaceae	<i>Ptychopetalum olacoides</i> Benth.	Cascas do caule e raízes	Antidepressiva, antioxidante e anticolinesterase	42, 43, 44 e 45	Piato et al., 2008 Siqueira et al., 2003 Siqueira et al., 2007 Tang et al., 2008
Olacaceae	<i>Schoepfia californica</i> Iguajil	Caule	-	41	Berry et al., 1991
Olacaceae	<i>Scorodocarpus borneensis</i> (Bail.) Becc.	Frutos e cascas do caule	Anti-bacteriana	19, 20, 21, 22, 23 e 24, 25, 26, 27 e 28	Wiat et al., 2001 Kubota et al., 1998 Lim et al., 1998
Olacaceae	<i>Ximenia americana</i> L.	Caule, folhas, sementes e raízes	Antibacteriana, anti-inflamatória e antineoplásica	48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63 e 64.	Mwangi et al., 1994 Eromosele & Eromosele, 2002 Fatope et al., 2000 Rezanka & Sigler, 2007 De Araújo et al., 2008
Olacaceae	<i>Ximenia caffra</i> var. <i>caffra</i>	Raízes e cascas do caule	Antibacteriana e disenteria		Mathabe et al., 2006 Fabry et al., 1998

CAPÍTULO 2

Extratos e compostos de planta com atividade antimalárica *in vivo* e *in vitro*

(Artigo a ser submetido à Revista Brasileira de Farmacognosia)

Extratos e compostos de plantas com atividade antimalárica *in vivo* e *in vitro*

Valdiléia Teixeira Uchôa¹ e Antonio Euzébio Goulart Sant'Ana¹

¹Universidade Federal de Alagoas – Instituto de Química e Biotecnologia – 57.072-970 Maceió – Al - Brasil

* Corresponding author. Tel.: 55.82.3241-1388; fax: 55.82.3214-1384

E-mail address: aegs@qui.ufal.br (Antônio Euzébio G. Sant'Ana^a).

RESUMO: O alcalóide quinina e o endoperóxido sesquiterpeno lactona artemisinina obtidos de plantas e seus derivados semisintéticos são ainda os principais medicamentos utilizados para o tratamento da malária. A adoção destes compostos na terapia antimalárica foi o marco inicial do estudo de plantas, na busca de novos compostos antimaláricos. Várias plantas foram estudadas e novos compostos tem revelado esta ação *in vitro* ou mesmo *in vivo* mas nenhum se tornou uma nova molécula de sucesso como a quinina e artemisinina. Nesta revisão bibliográfica foram analisadas 315 espécies de plantas pertencentes a 102 famílias que apresentaram ação antimalárica em testes *in vivo* ou *in vitro*. A família Asteraceae apresentou o maior número de espécies com ação antimalárica. Os extratos e compostos considerados ativos são aqueles que apresentaram um $IC_{50} \leq 10 \mu\text{g/mL}$ em teste *in vitro* frente as cepas do *Plasmodium falciparum* e os que apresentaram em teste *in vivo* uma redução da parasitemia $\geq 30\%$ frente ao *Plasmodium berghei* nas concentrações $\leq 1000 \text{ mg/Kg}$.

Unitermos: Plantas, Atividade Antimalárica; Teste *in vivo* e *in vitro*

ABSTRACT: The alkaloid quinine and endoperoxide sesquiterpene lactone artemisinin obtained from plants and their semi-synthetic derivatives are the main drugs used to treat malaria. This was the first milestone in the ethnopharmacology study of plants with antimalarial activity that revealed others compounds showing antimalarial activity *in vitro* or *in vivo* but none of them became a lider compound with quinina and artemisinina. In this review were examined 315 species of plants belonging to 102 families with antimalarial action *in vivo* or *in vitro*. The Asteraceae family had the largest number of species with antimalarial action. Compounds and extracts are considered active when they have $IC_{50} \leq 10 \mu\text{g/mL}$, *in vitro* test using the

Plasmodium falciparum and/or *in vivo* test showing the reduction of parasitemy $\geq 30\%$ against the *Plasmodium berghei*.

INTRODUÇÃO

A malária continua sendo uma das mais importantes doenças tropicais e estima-se que ocorram mais de 3 milhões de vítimas fatais anualmente no mundo (WHO, 2008). A doença é um dos maiores problemas para o controle da malária foi o surgimento e a propagação progressiva da resistência do *Plasmodium falciparum* às drogas em uso tais como cloroquina, mefloquina, pirimetamina, sulfadoxina e até mesmo a quinina (**Figura 01**) (Muregi et al., 2007; Soh & Benoit-Vical, 2007). Rahman et al., 1999).

As alternativas para o tratamento são poucas e há uma necessidade urgente de pesquisas por novas drogas para o tratamento da malária. Como a maioria dos povos afetados pela malária possui acesso limitado à medicação, devido ao alto custo, as plantas medicinais representam uma possibilidade viável. Uma metodologia que vem utilizada é a escolha das plantas baseada no uso para o tratamento de febres que seria um tratamento para os sintomas da fase aguda da doença. Historicamente, a maioria das drogas antimaláricas é derivada de plantas medicinais ou de substâncias isoladas das plantas usadas como modelos estruturais (Rukunga et al., 2007).

A quinina e a artemisinina (**Figura 01.**), drogas usadas no tratamento da malária, foram obtidas das espécies *Cinchona* sp (*C. calisaya* e *C. succirubra*) e *Artemisia annua* respectivamente, e serviram também como bases para o desenvolvimento de novas drogas (Rukunga et al., 2007; Muthaura et al., 2007).

Assim é importante realizar pesquisas com extratos de plantas medicinais, com uma abordagem adequada, utilizando-se de plantas que sejam utilizadas no tratamento de febre e ou malária. A escolha randômica de plantas é importante, mas é muito cara e deve ser empregada em

um programa de larga abrangência na procura de substâncias ativas da mesma forma que o uso da quimiossistemática nesta escolha. Nos últimos anos está havendo uma crescente preocupação na avaliação do perfil farmacológico, toxicológico e fitoquímico de vários extratos de plantas visando seu uso medicinal e uma procura orientada e crescente por plantas com atividade antimalárica (Roumy et al., 2007).

A Organização Mundial de Saúde já reconhece o uso de plantas como uma fonte terapêutica devido a sua eficácia comprovada pelo uso. No Brasil, a fitoterapia está incluída no programa de saúde pública e o principal órgão responsável pela regulamentação de plantas medicinais e seus derivados é a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), autarquia do Ministério da Saúde que tem como papel proteger e promover a saúde da população garantindo a segurança sanitária de produtos e serviços e participando da construção de seu acesso (Brasil, 1999).

Os produtos naturais e seus derivados são tradicionalmente as fontes mais comuns de drogas e representam mais que 30% do mercado farmacêutico corrente. Com base na lista de substâncias de origem vegetal cadastradas na Anvisa, fez-se um levantamento, em outubro de 2007, atualizado em março de 2008, foram através dos anos encontrados um total de 512 medicamentos fitoterápicos registrados, sendo 80 fitoterápicos associados e 432 simples, ou seja, obtidos de derivados de apenas uma espécie vegetal (Carvalho et al., 2008).

O Brasil possui grande potencial para o desenvolvimento da fitoterapia aplicada no tratamento de doenças já que possui a maior diversidade vegetal do mundo, possui ampla sociodiversidade, sendo o uso de plantas medicinais vinculadas ao conhecimento tradicional e tecnologia para validar cientificamente este conhecimento (Albuquerque & Hanazaki, 2006). Para alcançar um maior desenvolvimento nesta área são necessários mais grupos de pesquisas,

bem direcionados para este fim e melhor assistidos pelos órgãos de financiamento. Atualmente existem poucos grupos dedicados efetivamente ao estudo dos antimalariais.

Visando dar uma contribuição ao estudo das plantas no tratamento da malária, neste trabalho estamos fazendo uma revisão bibliográfica sobre os extratos e compostos oriundos de plantas que apresentam atividade antimalárica em ensaios *in vitro* e *in vivo* dentro de uma concentração que pode ser considerada promissora.

METODOLOGIA

Para o desenvolvimento dessa revisão foram utilizadas as bases de dados Web of Science, Sciencedirect, Periódicos CAPES, Scielo e Scirus, utilizando como descritores “plants with antimalarial activity”. Todas as publicações citadas usavam a metodologia tradicional, com a cultura contínua do *Plasmodium falciparum* (Trager & Jensen, 1976) ou a triagem pelo método da incorporação de hipoxantina (Desjardins et al., 1979) para os teste *in vitro*. Nos ensaios antimalárico *in vivo*, utilizaram-se o parasita *Plasmodium berghei*, teste baseado no protocolo de 4 dias de ensaio supressivo, como descrito por Peters et al., 1975.

Foram selecionados os artigos que descreviam extratos ou substâncias que apresentavam valores de $IC_{50} \leq 10 \mu\text{g/mL}$, referentes a atividades antimalárica *in vitro* e mostravam redução acima de 30% da parasitemia provocada por *P. berghei*, referente a atividade antimalárica *in vivo* $\leq 1000 \text{ mg/Kg}$. Após excluir os artigos que não atendiam aos critérios acima, obtivemos 84 artigos e os resultados obtidos foram descritos na forma de texto e tabela. A tabela relata as famílias, espécies de plantas como uso popular, composto/fração/extrato ativo a testes antimaláricos *in vivo* e *in vitro* e referências bibliográficas (**Tabela 01**).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Nesta revisão, foram encontradas 315 plantas que apresentavam atividade antimalárica *in vivo* ou *in vitro*, das quais 228 tratavam da atividade relacionada aos extratos ou frações obtidos em etanol, metanol, água, clorofórmio, diclorometano, acetato de etila, hexano, acetona, éter de petróleo ou mistura dos mesmos e 87 tratavam de compostos puros isolados das plantas.

As 315 plantas ativas citadas pertencem a 102 famílias diferentes, dentre as quais a família Asteraceae destaca-se com o maior número de plantas ativas, perfazendo um total de 29 plantas com $IC_{50} < 10 \mu\text{g/mL}$. Historicamente, a família Asteraceae é muito estudada na medicina tradicional contra a malária e este destaque é em grande parte devido a *Artemisia annua*, planta da medicina tradicional chinesa usada no tratamento de hemorróida e febre. Esta planta tornou-se um marco no estudo da atividade antimalárica por ser a fonte da artemisinina (**figura 01**) que vem sendo usada desde os anos 1980 para o tratamento da malária causada pelo *Plasmodium falciparum* resistente a outras drogas.

No momento, a artemisinina é a base de uma grande família de drogas recomendadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para combater a malária nos países onde o protozoário é altamente resistente aos fármacos disponíveis (Muthaura et al., 2007). Mais recentemente, o uso de seu principal derivado, o artesunato, foi também recomendado para tratar casos graves da doença em gestantes e crianças na África (Muthaura et al., 2007).

O Neem, nome popular da planta indiana *Azadirachta indica* (Meliaceae), nativo do subcontinente indiano e encontrado abundantemente na Índia, no Paquistão e na Birmânia, é igualmente conhecido pelas populações do Oeste e Leste da África para o tratamento da malária. O decocto do Neem foi utilizado por indianos ao longo dos séculos para o tratamento das febres provocadas pela malária (Dhar et al., 1998). Na África, utilizam chás de suas folhas frescas que

são tomados em doses múltiplas para o tratamento de febre causada pela malária e também como repelente de insetos por possuir propriedade inseticida (Soh & Benoit-Vical, 2007).

Alguns estudos realizados *in vitro* contra o *Plasmodium falciparum* mostraram-se promissores enquanto os estudos *in vivo* em camundongos com o *Plasmodium berghei* não o foram, sugerindo-se que os camundongos não metabolizam os extratos do Neem da mesma forma que os seres humanos (Muthaura et al., 2007). O estudo fitoquímico do extrato das folhas levou ao isolamento dos triterpenos gedunina e nimbinina, que foram ativos no estudo *in vitro*, mas não inibiram o *Plasmodium berghei* em camundongos na dose de 90 mg/kg/dia (via intraperitoneal) (Soh & Benoit-Vical, 2007; Muthaura et al., 2007).

Na Tabela 01, destacam-se os extratos das espécies *Artemisia annua* e *Azadirachta indica*, com valores de IC₅₀ de 3,9 µg/mL (O’Neil et al., 1987; Phillipson & Wright, 1991) e 2,35–12,5 µg/mL, respectivamente (Benoit-Vical et al., 1998).

As espécies *Centipeda orbicularis*, *Conyza albida*, *Brachylaena ramiflora* e *Dicoma indica* pertencentes a família Asteraceae, apresentaram maior atividade que *Artemisia annua* (Asteraceae) e *Azadirachta indica* (Meliaceae), com IC₅₀ 2,3; 2,0; 1,1 e 1,1 µg/mL (**Tabela 01**), indicando serem espécies promissoras no estudo de atividade antimalárica *in vitro* (Kutuura et al., 2007; Rasoanaivo et al., 1999)

Outras famílias tais como Anonaceae, Apocynaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Meliaceae, Rubiaceae, Rutaceae e Simaroubaceae também se destacam pelo uso na medicina popular para o tratamento da malária ou febre (**Tabela 01**).

Uma fonte de compostos potencialmente antimaláricos é a espécie *Picralima nitida* (Apocynaceae) oriunda do continente africano cujos extratos aquosos da casca e semente são utilizados para o tratamento da malária e febre, e as sementes em pó são usadas na cura de

pneumonia e outras infecções (François et al., 1996). O extrato da semente da *P. nitida*, nos teste *in vivo* apresentou redução da parasitemia do *P. berghei* de 90,20% na concentração de 115 mg/kg (Okokon et al., 2007) e o extrato da casca do caule apresentou atividade *in vitro* com IC₅₀ de 0,54 µg/mL (François et al., 1996). Esta planta contém vários alcalóides do tipo indólico e dihidroindólico, mas foram inativos nos ensaios clínicos realizados para a gripe e malária (Tane et al., 2002).

A espécie *Euphorbia hirta* (Euphorbiaceae) é utilizada em países tropicais e subtropicais para o tratamento de várias doenças como asma, diarreia e amebíase. A análise fitoquímica (screening) revelou a presença de terpenos ou esteróides, flavanóides, bem como saponinas, taninos e antocianinas, classe de compostos que podem apresentar atividade antimalárica (Tona et al., 2004). O extrato etanólico da *E. hirta* apresentou atividade antimalárica *in vivo* com redução da parasitemia de 69,44% na concentração de 400 mg/kg (Tona et al., 1999).

Nos testes com o extrato da *Apuleia leiocarpa* (Fabaceae), na dose de 250 mg/kg, observou-se a inibição do crescimento do *P. berguei* de 53% que caiu para 31% quando a dose foi de 100 mg/kg, já em teste *in vitro* o extrato apresentou-se inativo (Muñoz et al., 2000). Esta planta apresenta atividade anti-inflamatória e sedativa, devido à presença do triterpeno β-amirina (Bandeira et al., 2007). Esta espécie é usada popularmente para reduzir qualquer tipo de febre o que parece ser justificado pela presença de β-amirina (embora ainda não seja comprovada a sua ação antipirética) e exibe também propriedade antimalárica ajudando a reduzir o estado febril causado pela malária (Muñoz et al., 2000).

O extrato das cascas do caule da *Swietenia macrophylla* (Meliaceae), em testes *in vivo* promoveu redução da parasitemia de 73% na concentração de 250 mg/kg e *in vitro* uma inibição de 78% quando usada na concentração de 100 mg/mL. A decocção das sementes de *S.*

macrophylla é usada como remédio antimalárico na Indonésia. No entanto, convém salientar que a semente dessa espécie também é utilizada para induzir hemorragia uterina (Muñoz et al., 2000).

A *Morinda lucida* (Rubiaceae) é uma planta medicinal comumente encontrada no Oeste da África e utilizada no tratamento de febres, malária, dores e também é conhecida por produzir efeitos purgativos. O extrato da casca do caule desta planta, após a prospecção fitoquímica observa-se a presença de antraquinonas, que podem ser atribuída a atividade antiplasmodial contra os *P. berghei* e *P. falciparum* (Olajide et al., 1999, Tona et al., 1999). O extrato das folhas da *M. lucida*, em testes *in vivo* apresentou redução da parasitemia do *P. berghei* de 67,50% na concentração de 200 mg/kg (Cimanga et al., 2006).

Várias classes de metabólitos secundários de plantas são responsáveis pela atividade antimalárica, os mais conhecidos e de maior diversidade biológica são os alcalóides, terpenos e flavanóides.

A quinina foi isolada das cascas de plantas do gênero *Cinchona*, família Rubiaceae, nativas das regiões altas do Peru e levadas da Europa pelos jesuítas, por isto conhecida como “pó dos jesuítas ou quinas”, estas plantas foram usadas na Europa a partir de 1770 para o tratamento da malária (Krettli, 2009). Este produto natural é um alcalóide e foi o primeiro composto utilizado no tratamento contra a malária (Narasu et al., 2000). A quinina ao longo dos anos foi sendo substituída por fármacos sintéticos como a primaquina, a cloroquina e a mefloquina. No entanto, com a recente resistência dos *Plasmodium* a estes fármacos mais modernos, a quinina poderá ser mais uma vez uma promessa no tratamento da malária (Kayser et al., 2003).

Segundo Pelletier (1983), os alcalóides são substâncias orgânicas cíclicas contendo um nitrogênio em estado de oxidação negativo e cuja distribuição é limitada entre os organismos vivos. Eles destacam-se como uma classe de compostos com atividade antimalárica relevante. Da família Apocynaceae, foram isolados os alcalóides aspidocarpina (2), ellipticina (3) e

pleiomutinina (**11**), que apresentaram atividade contra as cepas do *Plasmodium falciparum* com valores de IC₅₀ de 0,007; 0,018 e 5,2 µg/mL, respectivamente (Andrade-Neto et al., 2001; Addae-Kyereme et al., 2001). Os alcalóides harman (**4**), tetrahydroharman (**5**), budmunchiamina K (**12**), 6-hidroxibudmunchiamina K (**13**), 5-normetilbudmunchiamina K (**14**), 6-hidroxi-5-normetilbudmunchiamina K (**15**) e 9-normetilbudmunchiamina K (**16**), isolados das famílias Combretaceae e Fabaceae apresentaram atividade antimalárica *in vitro* com valores de IC₅₀ que variam de 3,8 a 0,09 µg/mL (Ancolio et al., 2002; Rukunga et al., 2007).

O alcalóide criptolepina (**6**), apresentou a maior atividade antimalárica com IC₅₀ de 0,13 µM (Banzouzi et al., 2004), este valor aproxima-se do controle cloroquina (Kirby et al., 1995), conforme a **Tabela 01**. Já os alcalóides, desihidoroemerina (**7**), cefarantina (**8**), nitinina (**9**), avicina (**10**) e 9-metilcantina-6-ona (**17**), foram isolados da família Menispermaceae, Rutaceae e Simaroubaceae, apresentando valores de IC₅₀ variando de 0,6 a 0,1 µg/mL (Chea et al., 2007; Jullian et al., 2006; Chan et al., 2004). Da planta *Crinum macowanii* (Amaryllidaceae) foi isolado o alcalóide anidrolicorina-6-ona (**1**), que apresentou valor de IC₅₀ 6,10 µg/mL (Rayne & Mazza, 2007).

Após a descoberta da artemisinina, o principio ativo da *Artemisia annua*, uma lactona sesquiterpênica com um grupo endoperóxido, muito outros terpenos tem sido investigados quanto a atividade antimalárica (Dhingra et al., 2000). Inclusive um teste para peróxidos foi muito utilizado para detecção deste grupo funcional na expectativa de encontrar outros compostos ativos (Dhingra et al., 2000). Nas folhas da espécie *Hypoestes rosea* (Acanthaceae), foi isolado um diterpeno, o hipoestoxido (**18**), que apresentou atividade antimalárica *in vivo* (250 mg/kg, redução de 83% da parasitemia) e *in vitro* (IC₅₀ de 10 µM) (Ojo-Amaize et al., 2007), descritos na **Tabela 01**.

Das folhas da *Ajuda remota* (Asteraceae), foi isolado o ergosterol-5,8-endoperóxido (**22**) um esteróide com as mesmas características da artemisinina, cujo IC₅₀ observado foi 8,2 µg/mL. Este composto foi isolado pela primeira vez na planta *A. remota* e apresenta atividade antiplasmodial podendo servir como um modelo na busca de novas drogas antimaláricas (Kuria et al., 2002).

Dois diterpenos foram isolados das raízes da *Harpagophytum procumbens*, 8,11,13-abietatrieno-12-ol (**31**) e 8,11,13-totaratrieno-12,13-diol (**32**), ambos apresentaram atividade antimalárica contra o *P. falciparum* com IC₅₀ de 1,0 µg/mL (Clarkson et al., 2003). De uma espécimen do gênero *Vitex*, que possui atividade antimicrobial, antioxidante, anti-inflamatória e antimalárica, foi isolado o diterpeno 12S,16S/R-dihidroxi-ent-labda-7,3-dien-15,16-olido (**35**), que apresentou atividade *in vitro* com IC₅₀ de 3,0 µg/mL, contra cepas resistentes a cloroquina FCR-3 do *P. falciparum*. Da *Salvia radula* foi isolado um diterpeno, o óxido de betulafolientriol (**25**) que apresentou atividade *in vitro* com IC₅₀ de 1,0 µg/mL, contra cepas resistentes a cloroquina FCR-3 do *P. falciparum* (Kamatoua et al., 2008).

Vários triterpenos foram isolados das famílias Apocynaceae, Hypericaceae, Iridaceae e Rubiaceae. Da planta *Holarrhena florinbunda* (Apocynaceae) foram isolados o lupeol (**19**) e derivados (**20 e 21**) que apresentaram valores IC₅₀ de 84 µM a 282 µM (Fotie et al, 2006). Os triterpenos fridelano-3-ona (**23**) e ácido betulínico (**24**), isolados das raízes da *Houngana madagascariensis* (Hypericaceae), também foram ativos com IC₅₀ de 7,7 e 5,1 µM, respectivamente (Lenta et al., 2007).

Do rizoma da *Iris germanica* (Iridaceae) isolou-se um triterpeno, denominado de iridal (**34**), com atividade antimalárica promissora (IC₅₀ 1,8 µg/mL) (Benoit-Vical et al., 2003). Das partes aéreas da *Gardenia saxatilis* (Rubiaceae), o triterpenóide isolado e que apresentou maior

atividade foi o ácido massagenico A (27), com IC₅₀ de 1,50 µg/mL, conforme a **Tabela 01**. (Suksamrarn et al., 2003).

Os limonóides constituem a classe de compostos com maior representatividade dos metabólitos secundário da ordem Rutales, que inclui as famílias Rutaceae, Meleiaceae e Simaroubaceae. São tetranortriterpenóides com esqueleto 4,4,8-trimetil-17-furanilestoroidal ligados a funções oxigenadas e apresentam propriedade inseticida, são biodegradáveis e possuem baixa toxicidade (Lee et al., 2008). No extrato etanólico da espécie *Khaya grandifoliola* (Meliaceae) destaca-se o gedunina (39) com IC₅₀ de 1,26 µg/mL. Segundo Bickii et al. 2000, este composto possui atividade três vezes maior que a cloroquina e vinte vezes menor que a quinina. Enquanto, Lee et al. 2008, destaca o antotocol (37), um limonóide isolado da *Khayna anthotheca* (Meliaceae), que possui uma potente atividade antimalárica *in vitro* (IC₅₀ de 1,40 µM a 0,17 µM), nos testes realizados utilizando-se o ensaio da [³H]-hipoxantina, quando comparado com outros limonóides naturais e antimaláricos atualmente em uso (cloroquina e quinina) (Lee et al., 2008).

Os quassinóides constituem uma classe de metabólitos encontrados quase que exclusivamente em plantas da família Simaroubaceae e químicamente são considerados triterpenos biodegradados com alto padrão de oxigenação, apresentando uma ampla faixa de atividade biológica, tais como antitumoral, antileucêmica, fitotóxica, inseticida, antiparasitária e antimalarial (Almeida et al., 2007; Chan et al., 2004). Das cascas do caule da *Eurycoma longifolia* (Simaroubaceae) foram obtidos compostos que apresentam atividade antimalárica *in vitro*. Foram obtidos os compostos, euricomalactona (43); 14,15,β-dihidroxiclaineanona (46); 13,21-dihidroeuricomana (45); 13,21-epoxieuricomana (47); euricomana (44) e euricomanol (48), com valores IC₅₀ de 0,67; 0,05; 0,67; 0,80; 0,04 e 0,05 µg/mL, respectivamente (Chan et al., 2004).

Da *Hannoa chlorantha* (raízes), foram obtidos os quassinóides chaparrinona (**49**), 14-hidroxi chaparrinona (**50**), 15-desacetillundulatonona (**51**) e 6- β -tigloiloxiglaucarubol (**52**), que apresentaram atividade antimalárica contra o *P. falciparum* com IC₅₀ de 0,04; 0,18; 0,05 e 0,26 μ g/mL, respectivamente. (François et al., 1998). Nas raízes da espécie *Picrolemma sprucei* destacam-se o neosergeolido (**53**) quassinóide com melhor atividade, IC₅₀ de 0,001 μ g/mL conforme a **Tabela 01**.

Quinonas e naftoquinonas foram utilizadas como antimalárico durante a Segunda Guerra, com boa eficiência, porém inferiores a cloroquina (França et al., 2008). Este fato faz com que as quinonas continuem a merecer atenção especial quando se busca compostos com atividade antimalárica (Carvalho et al., 1988; Kaur et al., 2009). Da espécie *Harungana madagascariensis*, foram isoladas 6 antraquinonas ativas, com IC₅₀ variando de 1,8 a 7,7 μ M (Lenta et al., 2007), presentes na **Tabela 01**.

Os flavonóides são largamente distribuídos nas plantas e são bem investigados quanto a atividade antiparasitária e para o tratamento e prevenção de várias doenças degenerativas. Hoje estuda-se muito a atividade antioxidante e protetora dos flavonóides (Kaur et al., 2009). Na busca de compostos com atividade antimalárica, vários flavonóides são estudados, sendo estes compostos encontrados em várias famílias de plantas como Anarcadiaceae, Euphorbiaceae e Leguminosae de onde foram obtidos flavonóides que apresentaram atividade antimalárica *in vitro* com IC₅₀ variando de 2,60 a 0,98 μ g/mL (**Tabela 01**) (Liu et al., 2007; Kim et al., 2004). Dentre estes destacam-se os flavanóides glicosilados (**54**, **55** e **56**), sendo o (2S,2''S)-7-7''-di-O-metil-tetrahydroamentoflavona (**68**), o flavanóide mais promissor, com IC₅₀ de 0,98 μ g/mL (Rayne & Mazza, 2007).

Na espécie *Garcinia kola* (Clusiaceae) foram isoladas chalconas que apresentavam valores de IC₅₀ de 0,8 a 4,4 µg/mL, destacando-se a 6-dioxi-γ-mangostina (**74**) como a de maior atividade antimalárica *in vitro*, conforme a **Tabela 01** (Hay et al., 2004). Já na espécie *Piper hostmannianum* (Piperaceae), a chalcona mais ativa foi a hostmanina A (**60**), com IC₅₀ de 101,27 µM (Portet et al, 2007).

Do caule da *Rourea minor* (Connaraceae) que possui atividade antiinflamatória, foram isolados os glicosídeos rourinosídeo (**85**) e rouremina (**86**), que apresentaram atividade antimalárica contra as cepas de *P. falciparum* resistentes a cloroquina (W2), com IC₅₀ de 2,1 e 4,5 µg/mL, respectivamente (He et al., 2006).

CONCLUSÃO

Várias plantas são usadas na medicina tradicional para o tratamento da malária e febre em todo o mundo. O estudo conduzido com base no conhecimento etnofarmacológico das plantas pode levar mais rapidamente a novos compostos ativos. No entanto, defendemos a idéia de que a escolha randômica e a escolha baseada na quimiossistemática não devem ser desprezadas, pois há plantas desconhecidas e que podem ser fonte de novos produtos ativos, a escolha randômica é cara e é mais apropriada para os grandes laboratórios. A nossa flora é gigantesca e comporta um estudo deste tipo. Alguns metabólitos como alcalóides, terpenos, quinonas e flavonóides, extraídos de plantas são candidatos a novos antimaláricos. A maioria dos compostos descritos como ativos foram testados apenas contra as cepas do *Plasmodium falciparum*, havendo a necessidade de testes para a atividade frente a outras espécies do gênero e cepas resistentes e testes *in vivo* para um melhor conhecimento do potencial das plantas e de produtos isolados. O número de plantas para as quais se conhecem o princípio ativo ainda é pequeno e mais atenção

deverá ser dada à obtenção do princípio ativo, pois isto auxiliará no desenvolvimento de novas drogas e na seleção de plantas por quimiossistemática.

Figura 1. Compostos atualmente usados como antimaláricos

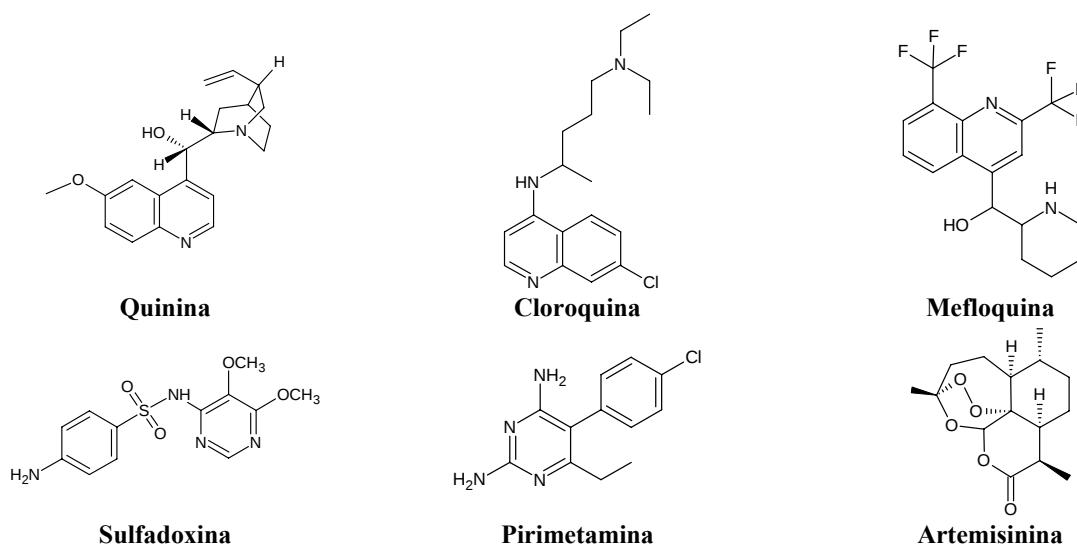


Figura 2. Estruturas dos compostos testados quanto a atividade antimalárica *in vivo* e/ou *in vitro*.

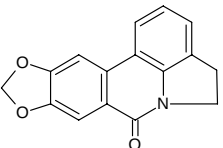
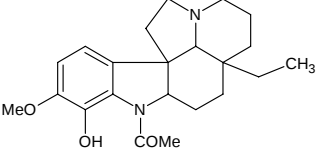
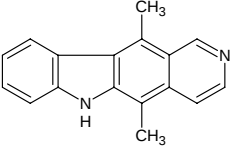
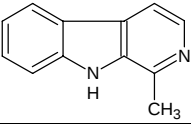
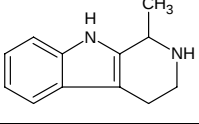
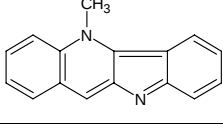
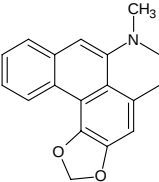
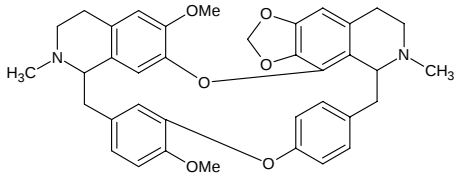
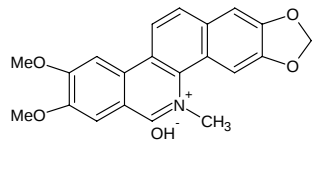
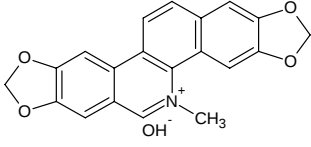
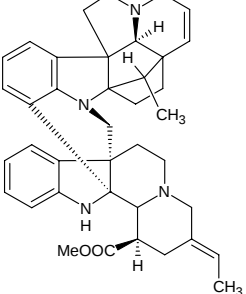
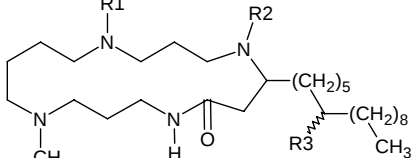
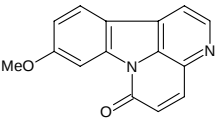
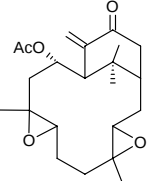
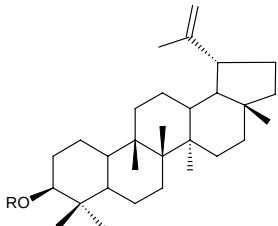
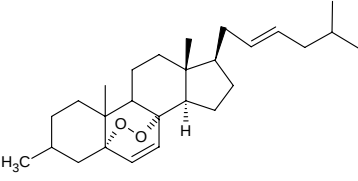
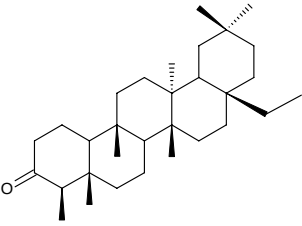
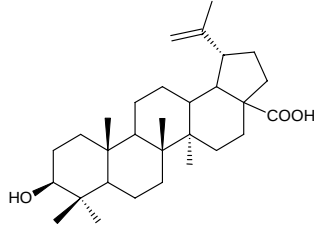
		
1	2	3
		
4	5	6
		
7	8	9
		
10	11	12
		
17	18	19
		
22	23	24

Figura 2. Continuação: Estruturas dos compostos testados quanto a atividade antimalárica *in vivo* e/ou *in vitro*

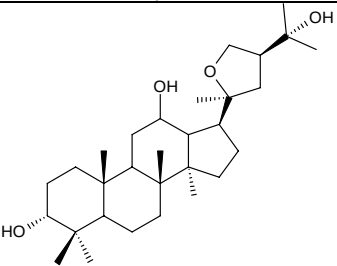
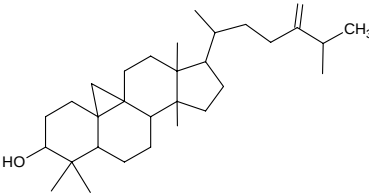
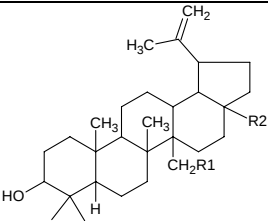
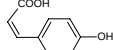
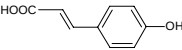
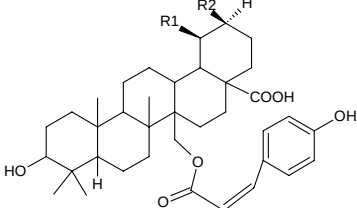
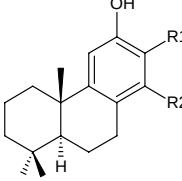
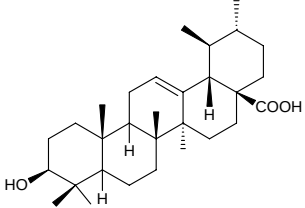
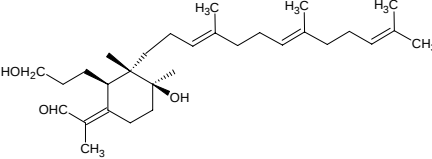
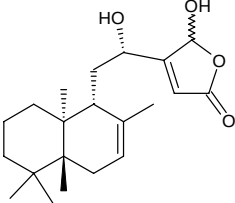
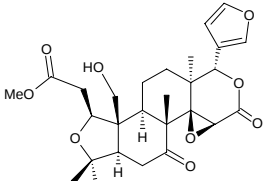
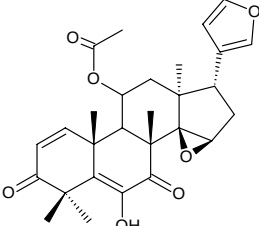
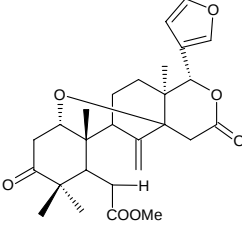
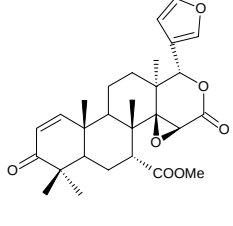
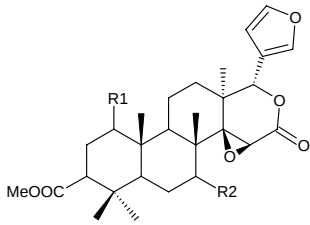
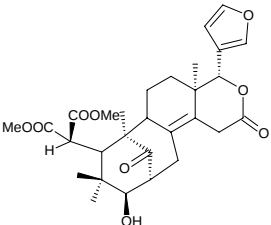
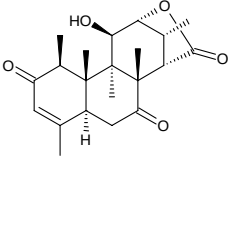
		
25	26	R1 27:  28:  R2 COOH COOH
		
R1 29: H 30: CH₃	31 R1: H R2: OH	32 H isopropil
		
34	35	36
		
37	38	39
		
R1 40: OH 41: COOCH₃	R2 COOCH₃ OH	43

Figura 2. Continuação: Estruturas dos compostos testados quanto a atividade antimalárica *in vivo* e/ou *in vitro*

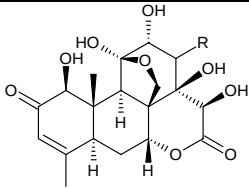
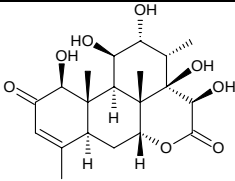
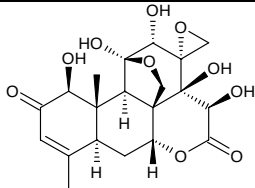
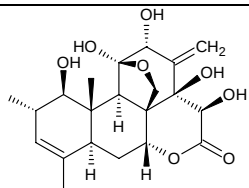
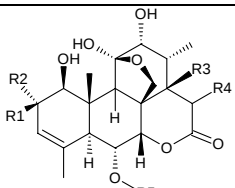
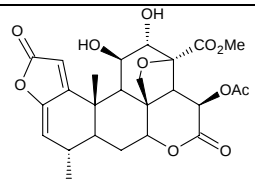
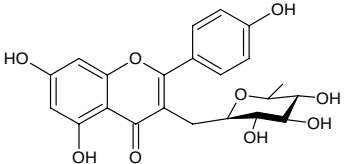
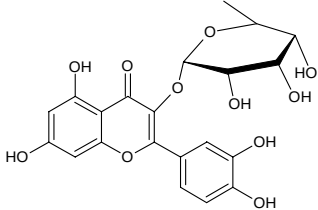
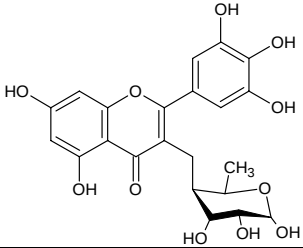
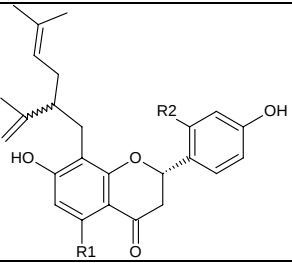
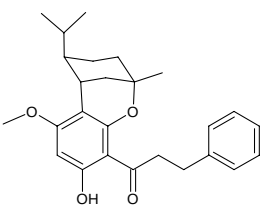
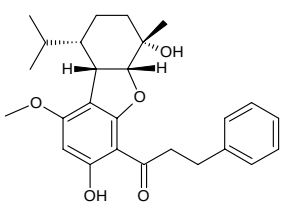
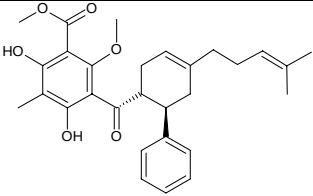
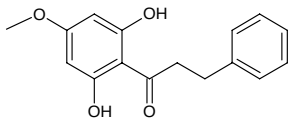
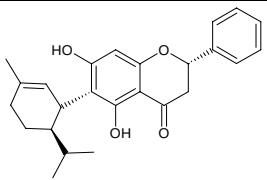
		
R 44: =CH ₂ 45: CH ₃	46	47
		
48	R1 R2 R3 R4 R5 49 =O H H H H 50 =O OH H H H 51 =O H OH O-tioglatto 52 H OH H H O-tioglatto	53
		
54	55	56
		
R1 R2 57: OCH ₃ OCH ₃ 58: OH OH 59: OH OCH ₃	60	61
		
62	63	64

Figura 2. Continuação: Estruturas dos compostos testados quanto a atividade antimalária *in vivo* e/ou *in vitro*

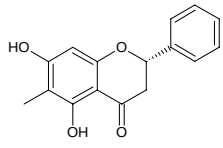
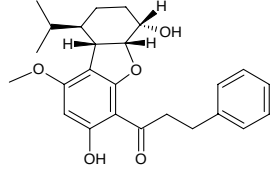
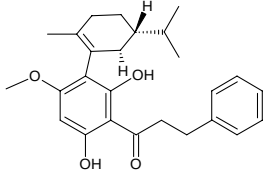
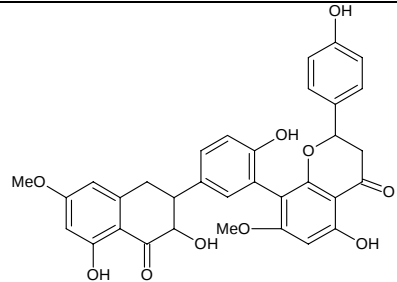
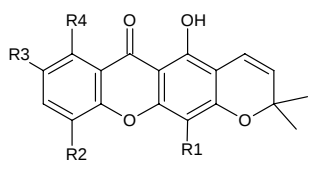
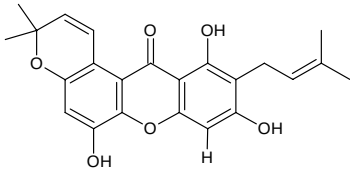
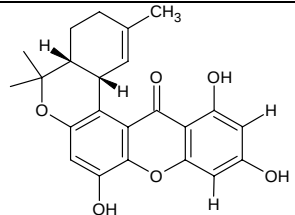
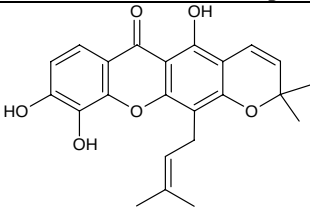
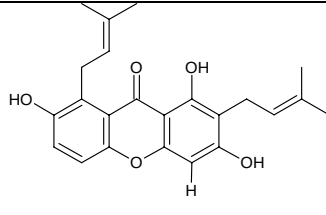
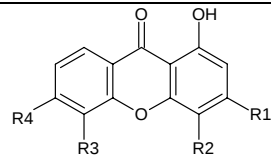
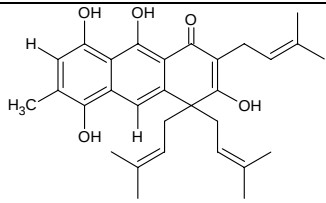
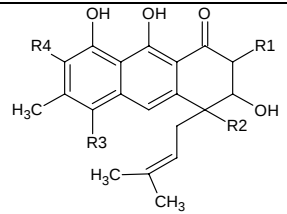
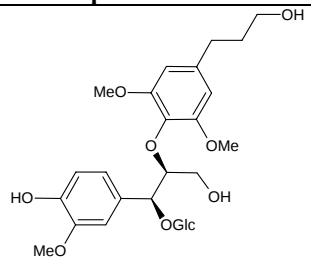
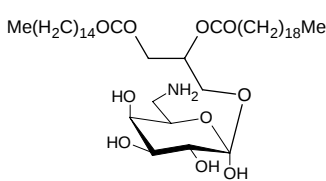
		
65	66	67
		
68	R₁ 69: isopentenila 70: isopentenila 71: H	72
		
73	74	75
		
R₁ 76: H 77: OH 78: OCH₃ 79: OH	80	R₁ 81: H 82: H 83: H 84: H
R₂ H isohexenila isopentanila isopentanila		R₂ Fenil Fenil H H
R₃ H H OH OH		R₃ H Fenil Fenil Fenil
R₄ OH OH OH OH		R₄ Fenil H Fenil H
		
85	86	

TABELA 01. Relação de plantas com atividade antimalárica em testes *in vivo* e *in vitro*

Família/Espécie	Parte da Planta	Uso popular	Compostos isolados (ativos)	Solvente de extração: percentual da atividade antimalárica <i>in vivo</i> e concentração (mg/Kg)	Solvente de extração: IC ₅₀ das plantas e composto antimaláricos (µg/ml) e (cepas testadas do <i>Plasmodium falciparum</i>) da atividade <i>in vitro</i>	Referências
Acanthaceae						
<i>Asystasia gangetica</i> T.	Folhas	Malária			CH ₂ Cl ₂ /MeOH: 7 (D10)	Clarkson et al., 2004.
<i>Hypoestes rosea</i>	Folhas	Anti-inflamatória	Hipoestoxido (18)	EtOH: 93,8 (250)	EtOH: 10,0 µM (ItG2)	Ojo-Amaize et al., 2007.
Amaranthaceae						
<i>Achyranthes aspera</i> L.	Toda planta	Malária			CH ₂ Cl ₂ /MeOH: 10 (D10)	Clarkson et al., 2004.
<i>Amaranthus spinosus</i> L.	Cascas do caule	Malária		H ₂ O: 31 (300)		Hilou et al., 2006.
<i>Gomphrena celosiodes</i>	Partes aéreas	Malária			CHCl ₃ : 6,83 (K1)	Weniger et al., 2004.
Amaryllidaceae						
<i>Crinum macowanii</i> Baker	Bulbo		Anidrolcorina-6-ona (1)		EtOH: 6,1 (D10)	Campbell et al., 2000.
Anacardiaceae						
<i>Ozoroa engleri</i> R.A. Fernandes	Cascas do caule	Malária			CH ₂ Cl ₂ : 1,7 (PfUP1)	Prozesky et al., 2001.
<i>Rhus natalensis</i> Bernh.	Folhas	Doenças venereas	(2S,2"S)-7,7"-di-O-metil tetrahydroamentoflavona (68)		CHCl ₃ : 0,98 (W2)	Rayne and Mazza, 2007.
Anonaceae						
<i>Annona crassiflora</i>	Raízes	Febre, doença de chagas			C ₆ H ₁₄ : 7,6 (FcB1)	De Mesquita et al., 2007.
<i>Artabotrys monteiroae</i> Oliv.	Galhos	Malária			CH ₂ Cl ₂ /MeOH: 8,7 (D10)	Clarkson et al., 2004.
<i>Cleistopholis patens</i> Engl.	Folhas	Malária			MeOH: 8,7 (K1)	Addae-Kyereme et al., 2001.
<i>Duguetia furfuracea</i> St. Hil.	Raízes	Febre e malária			EtOH: 6,2 (FcB1)	De Mesquita et al., 2007.
<i>Duguetia lanceolata</i> St. Hil.	Folhas	Malária			EtOH: 10,1 (K1)	Fischer et al., 2004.
<i>Guatteria</i> aff. <i>Schomburgkiana</i> Mart.	Cascas do caule	Malária		EtOH/H ₂ O: 36% (>500)		Muñoz et al., 2000.
<i>Polyathia suaveolens</i> Engl.	Cascas do caule	Escabiose e malária			MeOH: <1 (RPMI-1640)	Mesia et a., 2008.
<i>Xylopia aromática</i> Lam.	Raízes	Malária			C ₆ H ₁₄ : 4,7 (FcB1)	De Mesquita et al., 2007.
<i>Xylopia emarginata</i> Mart.	Raízes	Malária			C ₆ H ₁₄ : 4,9 (FcB1)	De Mesquita et al., 2007.
Apiaceae						
<i>Berula erecta</i> Coville	Planta inteira	Malária			CH ₂ Cl ₂ /MeOH: 6,6 (D10)	Clarkson et al., 2004.
<i>Centella asiática</i> Urb.	Folhas	Malária			CH ₂ Cl ₂ /MeOH: 8,3 (D10)	Clarkson et al., 2004.

Família/Espécie	Parte da Planta	Uso popular	Compostos isolados (ativos)	Solvente de extração: percentual da atividade antimalárica <i>in vivo</i> e concentração (mg/Kg)	Solvente de extração: IC ₅₀ das plantas e composto antimaláricos (µg/ml) e (cepas testadas do <i>Plasmodium falciparum</i>) da atividade <i>in vitro</i>	Referências
Apocynaceae						
<i>Aspidosperma desmanthum</i> Benth	Cascas do caule	Febre e malária	Aspidocarpina (2)		CHCl ₃ : 0,007 (K1)	Andrade-Neto et al., 2001.
<i>Aspidosperma macrocarpon</i> Woodson	Cascas das raízes	Febre e malária			EtOH: 4,9 (FcB1)	De Mesquita et al., 2007.
<i>Aspidosperma quebrado-blanco</i> Schlechtd.	Cascas do caule	Desinteria			EtOH/H ₂ O: 4,0 (F32)	Bourdy et al., 2004.
<i>Aspidosperma rigidum</i> Rusby	Cortex	Malaria			EtOH: 10 (3D7)	Kvist, et al., 2006.
<i>Aspidosperma vargasii</i> A.	Caule	Malária	Ellipticina (3)		CHCl ₃ : 0,018 (K1)	Andrade-Neto et al., 2001
<i>Cabucala madagascariensis</i> De Candolle	Folhas	Malária e reumatismo			EtOH: 1,3 (FCM29)	Rasoanaivo et al., 1999.
<i>Carissa edulis</i>	Raízes	Doenças venereas e gastro-intestinais			EtOH: 6,41 (D6)	Muthaura et al., 2007.
<i>Funtumia elastica</i> Preuss	Raízes	Febre			EtOH: 3,3 (FcB1)	Zirihi et al., 2005.
<i>Geissospermum laeve</i> Vellozo	Cascas do caule	Malária			EtOH/H ₂ O: 3,1 (F32)	Muñoz et al., 2000.
<i>Holarrhena floribunda</i>	Toda planta	Malária	Lupeol (19) 3-O-(3β-hidroxiieicosanol) lupeol (20) 3-O-[(2'--(tetracosiloxy) acetil] lupeol (21)		C ₆ H ₁₄ /CH ₂ Cl ₂ : 97 µM (FCR-3) C ₆ H ₁₄ /CH ₂ Cl ₂ : 282 µM (3D7)	Fotie et al., 2006. Fotie et al., 2006.
					C ₆ H ₁₄ /CH ₂ Cl ₂ : 84 µM (FCR-3)	Fotie et al., 2006.
<i>Pleiocarpa mutica</i> Benth.	Raízes		Pleiomutinina (11)		CH ₃ Cl/MeOH: 5,2 (K1)	Addae-Kyereme et al., 2001.
<i>Picralima nitida</i> Durand	Raízes Cascas do caule Frutos Sementes			EtOH: 90,2% (115)	CH ₂ Cl ₂ : 0,18 (NF54) CH ₂ Cl ₂ : 0,54 (NF54) H ₂ O: 1,58 (NF54)	François et al., 1996. François et al., 1996. François et al., 1996. Okokon et al., 2007.
<i>Rauvolfia vomitoria</i> Afzel.	Raízes				EtOH: 2,5 (FcB1)	Zirihi et al., 2005.
<i>Vallesia glabra</i> Link	Cascas do caule				EtOH/H ₂ O: 3,4 (F32)	Bourdy et al., 2004.
Araceae						
<i>Lasia spinosa</i> Thw.	Planta inteira	Malária			MeOH: 7,5 (W2)	Tran et al., 2003.
<i>Rhaphidophora decursiva</i> Schott	Folhas				CHCl ₃ : 4,41 (W2)	Zhang et al., 2002.
Araliaceae						
<i>Schefflera umbellifera</i> Baill.	Folhas Raízes				CH ₂ Cl ₂ : 3,7 (D10) CH ₂ Cl ₂ : 7,5 (D10)	Clarkson et al., 2004. Clarkson et al., 2004.
<i>Xysmalobium undulatum</i> L.	Planta inteira				CH ₂ Cl ₂ /MeOH: 6 (D10)	Clarkson et al., 2004.

Família/Espécie	Parte da Planta	Uso popular	Compostos isolados (ativos)	Solvente de extração: percentual da atividade antimalárica <i>in vivo</i> e concentração (mg/Kg)	Solvente de extração: IC ₅₀ das plantas e composto antimaláricos (µg/ml) e (cepas testadas do <i>Plasmodium falciparum</i>) da atividade <i>in vitro</i>	Referências
Arecaceae						
<i>Chamaedorea angustisecta</i> Burret	Folhas	Cicatrização		EtOH: 44% (1000)		Muñoz et al., 2000.
Aristolochiaceae						
<i>Aristolochia boliviensis</i> Kuntze	Partes aéreas				EtOH/H ₂ O: 10 (F32)	Bourdy et al., 2004.
Asclepiadaceae						
<i>Centella asiática</i> L.	Folhas	Febre			EtOH: 8,3 (D10)	Muthaura et al., 2007.
<i>Secamone afzelii</i>	Partes aéreas	Antiplasmodial			CHCl ₃ : 6,48 (K1)	Weniger et al., 2004.
<i>Streptocaulon juvenas</i> Lour.	Raízes	Malária			MeOH: 4,2 (W2)	Tran et al., 2003.
Asparagaceae						
<i>Asparagus virgatus</i> Baker	Planta inteira				CH ₂ Cl ₂ /MeOH: 8 (D10)	Clarkson et al., 2004.
Asphodelaceae						
<i>Aloe ferox</i> Mill	Planta inteira				CH ₂ Cl ₂ /MeOH: 8 (D10)	Clarkson et al., 2004.
<i>Aloe marlothii</i> A. Berger	Planta inteira				CH ₂ Cl ₂ /MeOH: 3,5 (D10)	Clarkson et al., 2004.
Asteraceae						
<i>Acanthospermum hispidum</i>	Caule	Malária			EtOH: 5,02 (W2)	Soh and Benoit-Vical, 2007.
<i>Ajuga remota</i> Benth.	Folhas	Diurética, hipertensão e malária	Ergosterol-5,8-endoperoxido (22)		CH ₂ Cl ₂ : 8,2 (FCA 20/GHA)	Kuria et al., 2002
<i>Artemisia afra</i> Jacq.	Folhas	Febre			CH ₂ Cl ₂ : 5,0 (D10)	Clarkson et al., 2004.
<i>Artemisia apiacea</i> Hance ex.	Partes aéreas	Malária			MeOH/H ₂ O: 3,0 (FCR-3)	Tran et al., 2003.
<i>Artemisia vulgaris</i> L.	Folhas	Malária			MeOH: 5,6 (W2)	Tran et al., 2003.
<i>Aspilia africana</i> Pers.	Folhas	Inflamação			AcOEt: 9,3 (D10)	Waako et al., 2007.
<i>Bidens pilosa</i> L.	Folhas	Malária			MeOH: 5 (D10)	Clarkson et al., 2004.
<i>Bothriocline longipes</i>	Folhas	Dores abdominais e malária			CHCl ₃ : 3,7 (RPMI 1640)	Katuura et al., 2007.
<i>Brachylaena ramiflora</i> Humbert	Folhas	Malária e febre			CHCl ₃ : 1,1 (FCM29)	Rasoanaivo et al., 1999.
<i>Centipeda orbicularis</i> Lour.	Folha	Cárie dentária			CHCl ₃ : 2,3 (FCM29)	Rasoanaivo et al., 1999.
<i>Conyza sp.</i>	Planta inteira	Malária			CHCl ₃ : 9,1 (RPMI 1640)	Katuura et al., 2007.
<i>Conyza albida</i> Spreng.	Planta inteira	Febre			CH ₂ Cl ₂ /MeOH: 2 (D10)	Clarkson et al., 2004.
<i>Conyza podocephala</i> DC.	Planta inteira	Febre			CH ₂ Cl ₂ /MeOH: 6,8 (D10)	Clarkson et al., 2004.
<i>Conyza scabrída</i> DC.	Flores	Doenças respiratórias			CH ₂ Cl ₂ /MeOH: 7,8 (D10)	Clarkson et al., 2004.
<i>Dicoma incana</i> Baker	Partes aéreas	Febre			CHCl ₃ : 1,1 (FCM29)	Rasoanaivo et al., 1999.

Família/Espécie	Parte da Planta	Uso popular	Compostos isolados (ativos)	Solvente de extração: percentual da atividade antimalárica <i>in vivo</i> e concentração (mg/Kg)	Solvente de extração: IC ₅₀ das plantas e composto antimaláricos (µg/ml) e (cepas testadas do <i>Plasmodium falciparum</i>) da atividade <i>in vitro</i>	Referências
Asteraceae (Continuação)						
<i>Helichrysum nudifolium</i> L.	Planta inteira	Doenças intestinais		EtOH: 31% (765)		Clarkson et al., 2004.
<i>Mikana</i> sp.	Partes aérea	Malária			CH ₂ Cl ₂ /MeOH: 6,8 (D10)	Muñoz et al., 2000.
<i>Osteospermum imbricatum</i> L.	Caule	Doenças venereas			CH ₂ Cl ₂ /MeOH: 7,3 (D10)	Clarkson et al., 2004.
<i>Pentzia globosa</i> Less	Caule Raízes	Malária			CH ₂ Cl ₂ : 9,5 (D10) CH ₂ Cl ₂ : 8 (D10)	Clarkson et al., 2004. Clarkson et al., 2004.
<i>Psiadia punctulata</i> Oliv.	Galhos				CH ₂ Cl ₂ : 9 (D10)	Clarkson et al., 2004.
<i>Senecio oxyriifolius</i> DC.	Folhas	Malária			CH ₂ Cl ₂ : 9 (D10)	Clarkson et al., 2004.
<i>Tarchonanthus camphoratus</i> L.	Caule				CH ₂ Cl ₂ /MeOH: 5,3 (D10)	Clarkson et al., 2004.
<i>Tessaria integrifolia</i>	Planta inteira				CH ₂ Cl ₂ /MeOH: 6 (D10)	Clarkson et al., 2004.
<i>Tithonia diversifolia</i> Hmsl.	Raízes			EtOH: 66 % (1000)		Muñoz et al., 2000.
<i>Tridax procumbens</i> L.	Partes aéreas				CH ₂ Cl ₂ : 10 (Dd2)	De Madureira et al., 2002.
<i>Vernonia amygdalina</i> Del.	Folhas				EtOH: 9,7 (K1)	Tona et al., 2004.
<i>Vernonia colorata</i> Willd.	Folhas				CH ₂ Cl ₂ /MeOH: 4,7 (D10)	Clarkson et al., 2004.
<i>Vernonia myriantha</i> Hook.	Folhas				CH ₂ Cl ₂ : 3 (D10)	Clarkson et al., 2004.
<i>Vernonia oligocephala</i> DC.	Folhas				CH ₂ Cl ₂ : 3,5 (D10)	Clarkson et al., 2004.
<i>Xanthium strumarium</i> L.	Frutos				H ₂ O: 6,6 (W2)	Tran et al., 2003.
Balanitaceae						
<i>Balanites maughamii</i> Sprague	Cascas do caule	Moluscicida			CH ₂ Cl ₂ : 1,94 (PfUP1)	Prozesky et al., 2001.
Bignoniaceae						
<i>Kigelia africana</i> Lam.	Folhas	Malaria			H ₂ O: 3,76 (D6)	Muthaura et al., 2007.
<i>Phyllarthron bernierianum</i> Seeman	Folhas	Febre e antitussígeno Diarréia			CHCl ₃ : 0,5 (FCM29)	Rasoanaivo et al., 1999.
<i>Tecomaria capensis</i> Thunb.	Galhos				H ₂ O: 10,2 (D10)	Clarkson et al., 2004.
<i>Tynanthus schumanni</i> Kuntze	Frutos			EtOH: 49% (510)		Muñoz et al., 2000.
Bixaceae						
<i>Bixa orellana</i> L.	Folhas	Febre e desinteria			H ₂ O: 9,3 (W2)	Hout et al., 2006.

Família/Espécie	Parte da Planta	Uso popular	Compostos isolados (ativos)	Solvente de extração: percentual da atividade antimalárica <i>in vivo</i> e concentração (mg/Kg)	Solvente de extração: IC ₅₀ das plantas e composto antimaláricos (µg/ml) e (cepas testadas do <i>Plasmodium falciparum</i>) da atividade <i>in vitro</i>	Referências
Bombacaceae						
<i>Ceiba pentandra</i> Gaertn.	Frutas	Malária			MeOH/H ₂ O: 3,0 (W2)	Tran et al., 2003.
<i>Chorisia insignis</i> Kunth	Folhas	Malária			EtOH/H ₂ O: >10 (F32)	Bourdy et al., 2004.
Boraginaceae						
<i>Anchusa cespitosa</i> Lam.	Toda planta				CH ₂ Cl ₂ : 9,5 (W2)	Fokialakis et al., 2007
Buddlejaceae						
<i>Buddleja globosa</i> Hope.	Caule	Desinteria			MeOH: 6,2 (K1)	Debenedetti et al., 2002.
Burseraceae						
<i>Protium glabrescens</i> Swart	Cascas do caule	Cefaléia e reumatismo		EtOH: 61% (250)		Deharo et al., 2001.
Caesalpinaceae						
<i>Campsiandra angustifolia</i> Benth.	Cortex	Malária			EtOH: < 10 (3D7)	Kvist, et al., 2006.
<i>Caesalpinia volkensii</i> Harms	Caule	Elefantiasse		MeOH: 33,3% (500)		Muregi et al., 2007.
Canellaceae						
<i>Warburgia stuhlmannii</i> Engl	Cascas do caule	Malaria			MeOH: 2,33 (W2)	Muthaura et al., 2007.
Caricaceae						
<i>Jacaratia digitata</i> Poeppig	Cascas do caule	Febre		EtOH: 76% (743)		Muñoz et al., 2000.
Cesalpinaceae						
<i>Cassia occidentalis</i> Linn.	Folhas				EtOH: 2,8 (K1)	Tona et al., 2004.
Celastraceae						
<i>Catha edulis</i> Vahl.	Folhas	Febre			CH ₂ Cl ₂ : 0,77 (D10)	Clarkson et al., 2004.
<i>Maytenus acuminata</i> Loes	Folhas Raízes	Anti-inflamatória		MeOH: 36,6% (500) MeOH: 41,5% (500)		Muregi et al., 2007. Muregi et al., 2007.
<i>Maytenus arbutifolia</i>	Planta inteira	Febre e malária			H ₂ O: 4,0 (K67)	Muthaura et al., 2007.
<i>Maytenus scutioides</i> Griseb.	Folhas	Malaria e febre			EtOH/H ₂ O: > 10 (F32)	Bourdy et al., 2004.
<i>Maytenus undata</i> Thunb.	Folhas	Malaria			MeOH: 9,89 (W2)	Muthaura et al., 2007.
Chrysobalanaceae						
<i>Parinari curatellifolia</i> Planch.	Raízes				CH ₂ Cl ₂ : 5,3 (D10)	Clarkson et al., 2004.
Clusiaceae						
<i>Garcinia kola</i> Heckel	Cascas do caule Raízes	Diaréia	Caloxantona C (69) Dimetilcalabaxantona (70) Calotwaitesixantona (71) Macluraxantona (72) Calozeiloxantona (73) Dombakinaxantona (74)		EtOH: 3,0 (K1) CH ₂ Cl ₂ /AcOEt: 1,3 (FcB1) CH ₂ Cl ₂ /AcOEt: 0,9 (FcB1) CH ₂ Cl ₂ /AcOEt: 1,0 (FcB1) CH ₂ Cl ₂ /AcOEt: 2,7 (FcB1) CH ₂ Cl ₂ /AcOEt: 4,4 (FcB1) CH ₂ Cl ₂ /AcOEt: 1,9 (FcB1)	Tona et al., 2004. Hay et al., 2004. Hay et al., 2004. Hay et al., 2004. Hay et al., 2004. Hay et al., 2004. Hay et al., 2004.

Família/Espécie	Parte da Planta	Uso popular	Compostos isolados (ativos)	Solvente de extração: percentual da atividade antimalárica <i>in vivo</i> e concentração (mg/Kg)	Solvente de extração: IC ₅₀ das plantas e composto antimaláricos (µg/ml) e (cepas testadas do <i>Plasmodium falciparum</i>) da atividade <i>in vitro</i>	Referências
Clusiaceae (Continuação)						
<i>Hypericum aethiopicum</i> Thunb	Folhas/Flores		6-dioxi-β-mangostina (75) 1,6-dihidroxixantona (76) Pancixantona A (77) Isocudranixantona B (78) Isocudranixantona A (79)		CH ₂ Cl ₂ /AcOEt: 0,8 (FcB1) CH ₂ Cl ₂ /AcOEt: 4,2 (FcB1) CH ₂ Cl ₂ /AcOEt: 1,6 (FcB1) CH ₂ Cl ₂ /AcOEt: 3,2 (FcB1) CH ₂ Cl ₂ /AcOEt: 2,3 (FcB1) CH ₂ Cl ₂ /MeOH: 1,4 (D10)	Hay et al., 2004. Hay et al., 2004. Hay et al., 2004. Hay et al., 2004. Hay et al., 2004. Clarkson et al., 2004.
Cochlospermaceae						
<i>Cochlospermum planchonii</i> Hook.	Raízes	Malária			CHCl ₃ : 4,4 (K1)	Muregi et al., 2007.
Combretaceae						
<i>Anogeissus leiocarpus</i> Guill.	Raízes Folhas	Desintéria e malária			MeOH: 2,6 (FcB1) CHCl ₃ : 3,8 (K1)	Okpekon et al., 2004. Vonthron-Sénécheau et al., 2003.
<i>Guiera senegalensis</i> (Gmel.)	Folhas		Harman (4) Tetraidroharman (5)		CHCl ₃ : 3,8 (K1) CHCl ₃ : 3,8 (K1)	Ancolio et al., 2002. Ancolio et al., 2002.
<i>Terminalia glaucescens</i> Planch.	Cascas do caule Folhas				CHCl ₃ : 1,8 (FcB1) H ₂ O: 2,43 (FcM-29)	Okpekon et al., 2004. Mustofa et al., 2000.
<i>Terminalia macroptera</i> Guill.	Raízes	Icterícia			MeOH: > 10 (W2)	Sanon et al., 2003.
<i>Terminalia spinosa</i>	Cascas do caule				EtOH: 9,9 (D6)	Muthaura et al., 2007.
<i>Vernonia lasiopus</i> O.Hoffm.	Folhas				AcOEt: 1,0 (K39)	Muregi et al., 2003.
Compositae						
<i>Vernonia lasiopus</i> O.	Folhas Raízes	Malária		MeOH: 59,3% (500)	H ₂ O: 3,2 (K39)	Muthaura et al., 2007. Muregi et al., 2007.
Connaraceae						
<i>Rourea minor</i> Aubl.	Caule	Anti-inflamatório	Rourenosideo (85) Rouremina (86)		CHCl ₃ : 2,1 (W2) CHCl ₃ : 4,5 (W2)	He et al., 2006. He et al., 2006.
Convolvulaceae						
<i>Ipomoea carnea</i> ssp.	Folhas				EtOH/H ₂ O: >10 (F32)	Bourdy et al., 2004.
Crassulaceae						
<i>Kalanchoe pinnata</i> Pers.	Entre casca	Anti-inflamatória		EtOH: 63% (1000)		Muñoz et al., 2000.
Cucurbitaceae						
<i>Momordica balsamina</i> L.	Caule	Febre			H ₂ Cl ₂ /MeOH: 5,3 (D10)	Clarkson et al., 2004.
<i>Momordica charantia</i> L.	Partes aéreas	Malária, e diabetes		EtOH: 70% (904)		Muñoz et al., 2000.
<i>Zehneria scabra</i> (L.f.) Sond.	Planta inteira	Cicatrizante			CH ₂ Cl ₂ /MeOH: 5,6 (D10)	Clarkson et al., 2004.
Ebenaceae						
<i>Euclea natalensis</i> A.DC.	Raízes				CH ₂ Cl ₂ /MeOH: 5,1 (D10)	Clarkson et al., 2004.
<i>Euclea undulata</i> Thunb.	Galhos				CH ₂ Cl ₂ /MeOH: 4,6 (D10)	Clarkson et al., 2004.

Família/Espécie	Parte da Planta	Uso popular	Compostos isolados (ativos)	Solvente de extração: percentual da atividade antimalárica <i>in vivo</i> e concetração (mg/Kg)	Solvente de extração: IC ₅₀ das plantas e composto antimaláricos (µg/ml) e (cepas testadas do <i>Plasmodium falciparum</i>) da atividade <i>in vitro</i>	Referências
Euphorbiaceae						
<i>Alchornea cordifolia</i> Schumach.	Folhas	Doenças respiratórias	Afzelina (54) Quercitrina (55) Miricitrina (56)	EtOH: 69,44% (400)	H ₂ O: 3,36 (FcM29)	Mustofa et al., 2000.
<i>Bridelia ferruginea</i> Benth.	Folhas	Malária			CHCl ₃ : 6,5 (FcB1)	Okpekon et al., 2004.
<i>Croton andinus</i> Muell.	Planta inteira	Asma e diarreia			H ₂ O: 6,9 (D10)	Clarkson et al., 2004.
<i>Croton geayi</i> Leandri	Cascas do caule	Malária			CHCl ₃ : 3,8 (FMC29)	Rasoanaivo et al., 1999.
<i>Croton gratissimus</i> Burch.	Folhas	Febre			CH ₂ Cl ₂ : 3,5 (D10)	Clarkson et al., 2004.
<i>Croton lobatus</i>	Raízes	Antiviral e asma			CHCl ₃ : 2,8 (K1)	Weniger et al., 2004.
<i>Croton menyhartii</i> Pax	Folhas	Febre			CH ₂ Cl ₂ /MeOH: 1,7 (D10)	Clarkson et al., 2004.
<i>Croton pseudopulchellus</i> Pax.	Cascas do caule	Anti-inflamatória			CHCl ₃ : 3,45 (PfUP1)	Prozesky et al., 2001.
<i>Euphorbia hirta</i> Linn	Planta inteira Partes aéreas	Malaria			MeOH: 1,7 (D10) MeOH: 1,7 (D10) MeOH: 1,7 (D10) MeOH/H ₂ O: 2,0 (W2)	Tona et al., 1999. Liu et al., 2007. Liu et al., 2007. Kaou et al., 2008.
<i>Flueggea virosa</i> Roxb.	Folhas	Malária			CHCl ₃ : 6,9 (K1)	Muregi et al., 2007.
<i>Hymenocardia acida</i> Tul.	Folhas	Malária	EtOH: 52% (1000)	EtOH: 52% (1000)	EtOH: 9,4 (FcB1)	Zirihi et al., 2005.
<i>Mareya micrantha</i> Benth.	Cascas do caule	Helmintismo			EtOH: 1,5 (D6) MeOH/H ₂ O: 3,2 (W2)	Muthaura et al., 2007. Tran et al., 2003.
<i>Phyllanthus muellerianus</i> Kuntze.	Folhas Partes aéreas	Malária			CHCl ₃ : 1,6 (FMC29)	Rasoanaivo et al., 1999.
<i>Phyllanthus acuminatus</i> Vahl.	Folhas	Desintéria e malária			EtOH: 2,5 (K1)	Tona et al., 2004.
<i>Phyllanthus decipiens</i> var. <i>antsihanakensis</i> Leandri	Cascas das raízes	Malaria			CH ₂ Cl ₂ /MeOH: 8 (D10)	Clarkson et al., 2004.
<i>Phyllanthus niruri</i> L.	Planta inteira	Pescicida			MeOH: 2,0 (RPMI-1640)	Mesia et a., 2008.
<i>Ricinus communis</i> L.	Caule	Febre e amidalite			H ₂ O: 2,4 (W2)	Hout et al., 2006.
<i>Sapium cornutum</i> Pax	Cascas do caule	Malária				
<i>Neoboutonia macrocalyx</i> Pax	Cascas do caule					
Dichapetalaceae						
<i>Dichapetalum guineense</i> DC.	Folhas	Malária			CHCl ₃ : 7,35 (K1)	Weniger et al., 2004.

Família/Espécie	Parte da Planta	Uso popular	Compostos isolados (ativos)	Solvente de extração: percentual da atividade antimalárica <i>in vivo</i> e concentração (mg/Kg)	Solvente de extração: IC ₅₀ das plantas e composto antimaláricos (µg/ml) e (cepas testadas do <i>Plasmodium falciparum</i>) da atividade <i>in vitro</i>	Referências
Fabaceae						
<i>Acacia tortilis</i> Forssk.	Planta inteira	Malária			CH ₂ Cl ₂ /MeOH: 4,8 (D10)	Clarkson et al., 2004.
<i>Albizia gummifera</i>	Cascas das raízes		Budmunchiamina K(12) 6-Hidroxibudmunchiamina K(13) 5-Normetilbudmunchiamina K(14) 6-Hidroxi-5-normetil budmunchiamina K(15) 9-Normetilbudmunchiamina K(16)		CHCl ₃ : 0,09 (NF) CHCl ₃ : 0,15 (NF)	Rukunga et al., 2007. Rukunga et al., 2007.
					CHCl ₃ : 0,10 (NF)	Rukunga et al., 2007.
					CHCl ₃ : 0,17 (NF)	Rukunga et al., 2007.
					CHCl ₃ : 0,12 (NF)	Rukunga et al., 2007.
<i>Apuleia leiocarpa</i> J. Vogel.	Cascas do caule	Febre e anti- inflamatório		EtOH: 51% (100)	EtOH/H ₂ O: 5,0 (F32)	Muñoz et al., 2000.
<i>Bowdichia virgilioides</i> Kunth	Cascas do caule				EtOH: 10 (D2)	Deharo et al., 2001.
<i>Caesalpinia paraguariensis</i> Burk.	Caule	Desinteria			EtOH/H ₂ O: >10 (F32)	Bourdy et al., 2004.
<i>Caesalpinia pluviosa</i> DC.	Cascas do caule				EtOH: 8,3 (D2)	Deharo et al., 2001.
<i>Crotalaria burkeana</i> Benth.	Raízes				CH ₂ Cl ₂ : 9,5 (D10)	Clarkson et al., 2004.
<i>Derris amazonica</i> Killip	Caule				EtOH/H ₂ O: 3,2 (F32)	Muñoz et al., 2000.
<i>Enterolobium contortisiliquum</i> Morong.	Folhas	Piscicida e malária			EtOH/H ₂ O: 10 (F32)	Bourdy et al., 2004.
<i>Erythrina lysistemon</i> Hutch	Cascas do caule				CH ₃ OCH ₃ : 4,80 (PfUP1)	Prozesky et al., 2001.
<i>Geoffroea decorticans</i> Bruk.	Folhas				EtOH/H ₂ O: 10 (F32)	Bourdy et al., 2004.
	Cascas do caule				EtOH/H ₂ O: 10 (F32)	Bourdy et al., 2004.
<i>Lovania mahafaliensis</i> Peltier	Partes aéreas	Antibacteriano		EtOH/H ₂ O: 53% (250)	CHCl ₃ : 5,7 (FMC29)	Rasoanaivo et al., 1999.
<i>Milletia pervilleana</i> Viguiet & Humbert	Cascas das raízes				CHCl ₃ : 9,7 (FMC29)	Rasoanaivo et al., 1999.
	Partes aéreas					
<i>Mundulea antanossarum</i> Humbert					CHCl ₃ : 1,1 (FMC29)	Rasoanaivo et al., 1999.
<i>Parkinsonia aculeata</i> L.	Galhos					
					CH ₂ Cl ₂ /MeOH: 9 (D10)	Clarkson et al., 2004.
<i>Pterocarpus angolensis</i> DC.	Raízes				CH ₂ Cl ₂ : 10 (D10)	Clarkson et al., 2004.
<i>Pterocarpus erinaceus</i> Poir	Folhas				CHCl ₃ : 0,87 (RPMI 1640)	Karou et al., 2003.

Família/Espécie	Parte da Planta	Uso popular	Compostos isolados (ativos)	Solvente de extração: percentual da atividade antimalárica <i>in vivo</i> e concentração (mg/Kg)	Solvente de extração: IC ₅₀ das plantas e composto antimaláricos (µg/ml) e (cepas testadas do <i>Plasmodium falciparum</i>) da atividade <i>in vitro</i>	Referências
Fabaceae (Continuação)						
<i>Sclerolobium</i> aff. <i>guianense</i> Benth.	Cascas do caule	Malária			EtOH/H ₂ O: 10 (F32)	Muñoz et al., 2000.
<i>Senna didymobotrya</i> Fresen.	Galhos				CH ₂ Cl ₂ /MeOH: 9,5 (D10)	Clarkson et al., 2004.
Flacourtiaceae						
<i>Casearia elliptica</i> Willd.	Folhas	Febre			EtOH: 9 (3D7)	Simonsen et al., 2001.
<i>Casearia sylvestris</i> Sw	Caule				C ₆ H ₁₄ : 0,9 (FcB1)	De Mesquita et al., 2007.
<i>Lunania parviflora</i> Spruce ex Benth	Galhos	Diarréia e vômito		EtOH: 59% (880)		Muñoz et al., 2000.
Hernandiaceae						
<i>Sparattanthelium amazonum</i> Mart.	Cascas do caule	Estomatite			EtOH/H ₂ O: 2 (F32)	Muñoz et al., 2000.
Hypericaceae						
<i>Harungana madagascariensis</i> Lam	Raízes	Malária	Bazouantrona (80) Ferruginina A (81) Harunganina (82) Harunganol A (83) Harunganol B (84) Friedelano-3-ona (23) Ácido betulínico (24)		CH ₂ Cl ₂ /MeOH: 1,8 µM (K1) CH ₂ Cl ₂ /MeOH: 5 µM (K1) CH ₂ Cl ₂ /MeOH: 2,7 µM (K1) CH ₂ Cl ₂ /MeOH: 3,7 µM (K1) CH ₂ Cl ₂ /MeOH: 3,7 µM (K1) CH ₂ Cl ₂ /MeOH: 7,7 µM (K1) CH ₂ Cl ₂ /MeOH: 5,1 µM (K1)	Lenta et al., 2007. Lenta et al., 2007. Lenta et al., 2007. Lenta et al., 2007. Lenta et al., 2007. Lenta et al., 2007. Lenta et al., 2007.
<i>Psorospermum androsaemifolium</i> Baker	Cascas do caule	Úlceras e malária			CHCl ₃ : 5 (FMC29)	Rasoanaivo et al., 1999.
Iridaceae						
<i>Iris germanica</i> L.	Rizomas	Malária	Iridal (34)		MeOH/H ₂ O: 1,8 (FcB1)	Benoit-Vical et al., 2003.
Kirkiaceae						
<i>Kirkia wilmsii</i> Engl.	Folhas				CH ₂ Cl ₂ /MeOH: 3,7 (D10)	Clarkson et al., 2004.
Lacistemaceae						
<i>Lacistema aggregatum</i>	Cascas do caule	Reumatismo e antipirético			CH ₂ Cl ₂ : 7,4 (FcB1)	Roumy et al., 2007.
Lamiaceae						
<i>Leonotis leonurus</i> L.	Galhos				CH ₂ Cl ₂ /MeOH: 5,4 (D10)	Clarkson et al., 2004.
<i>Leonotis ocyimifolia</i> Burm.	Frutos				MeOH: 6,1 (D10)	Clarkson et al., 2004.
<i>Ocimum americanum</i> L.	Planta inteira				CH ₂ Cl ₂ /MeOH: 4,2 (D10)	Clarkson et al., 2004.
<i>Ocimum gratissimum</i> L.	Planta inteira	Doenças respiratórias			MeOH: 6 (RPMI-1640)	Mesia et al., 2008.
<i>Ocimum micranthum</i> Willd.	Entre cascas	Estomatite e febre		EtOH: 37% (1000)		Muñoz et al., 2000.
<i>Salvia aurita</i>	Partes aéreas	Antiinflamatória e malária			DMSO: 9 (FCR-3)	Kamatou et al., 2008.
<i>Salvia chamelaeagnea</i>	Partes aéreas	Antiinflamatória e malária			DMSO: 8,7 (FCR-3)	Kamatou et al., 2008.

Família/Espécie	Parte da Planta	Uso popular	Compostos isolados (ativos)	Solvente de extração: percentual da atividade antimalárica <i>in vivo</i> e concentração (mg/Kg)	Solvente de extração: IC ₅₀ das plantas e composto antimaláricos (µg/ml) e (cepas testadas do <i>Plasmodium falciparum</i>) da atividade <i>in vitro</i>	Referências
Lamiaceae (continuação)						
<i>Salvia dolomitica</i>	Partes aéreas	Antiinflamatória e malária	Oxido de betulafolientriol (25)		DMSO: 7,6 (FCR-3)	Kamatou et al., 2008
<i>Salvia radula</i>	Partes aéreas	Antiinflamatória e malária			DMSO: 4,0 (FCR-3) CHCl ₃ /MeOH: 5,0 (FCR-3)	Kamatou et al., 2008 Kamatou et al., 2008
<i>Salvia repens</i>	Partes aéreas	Antiinflamatória e malária			DMSO: 8,25 (FCR-3)	Kamatou et al., 2008
<i>Salvia stenophylla</i>	Partes aéreas	Antiinflamatória e malária			DMSO: 6,5 (FCR-3)	Kamatou et al., 2008
<i>Satureja parvifolia</i> Epling.	Planta inteira				MeOH: 2,6 (K1)	Debenedetti et al., 2002.
Lauraceae						
<i>Licaria canella</i> Kostermans	Cascas do caule	Doenças gastro-intestinais			EtOH: 3,2 (D2)	Deharo et al., 2001.
<i>Nectandra</i> aff. <i>hihua</i> Rohwer	Cascas do caule			EtOH: 61% (250)	EtOH: 3,8 (D2)	Deharo et al., 2001.
<i>Nectandra cuspidata</i> Nees	Cascas do caule	Estomatite		EtOH/H ₂ O: 61% (250)		Muñoz et al., 2000.
<i>Ocotea laevis</i> Kostermans	Cascas do caule				CHCl ₃ : 0,9 (FMC29)	Rasoanaivo et al., 1999.
Lecythydaceae						
<i>Barringtonia racemosa</i> L. Roxb.	Galhos				CH ₂ Cl ₂ /MeOH: 5,7 (D10)	Clarkson et al., 2004.
Leguminosae						
<i>Sophora flavescens</i> Aiton	Raízes	Antipirética	(2S)-2'-metoxikurarinona (57) Soforaflavanona (58) Leachianona A (59)		MeOH: 2,4 (FCR-3) MeOH: 2,6 (FCR-3) MeOH: 2,1 (FCR-3)	Kim et al., 2004. Kim et al., 2004. Kim et al., 2004.
Liliaceae						
<i>Dracaena cambodiana</i> Pierre	Caule	Febre e tônico			CH ₂ Cl ₂ : 8,7 (W2)	Hout et al., 2006.
Loganiaceae						
<i>Strychnos</i> sp	Folhas	Malária			EtOH: 3,2 (FMC29)	Rasoanaivo et al., 1999.
Maesaceae						
<i>Maesa lanceolata</i> Forssk	Galhos				CH ₂ Cl ₂ /MeOH: 5,9 (D10)	Clarkson et al., 2004.
Malpighiaceae						
<i>Mascagnia macrophylla</i> Rusby	Cascas do caule	Diarréia			EtOH/H ₂ O: 1,7 (F32)	Muñoz et al., 2000.
Malvaceae						
<i>Sida acuta</i> Burm. F.	Partes aéreas Folhas	Malaria	Criptolepina (6)		CHCl ₃ : 0,13 µM (FcM29) CHCl ₃ : 0,87 (FcM29)	Banzouzi et al., 2004. Karou et al., 2003.
<i>Sida rhombifolia</i> L.	Entre cascas	Febre e Diarréia		EtOH: 42% (1000)		Muñoz et al., 2000.
Marantaceae						
<i>Thalia geniculata</i>	Raízes	Antiplasmodial			MeOH: 6,38 (K1)	Weniger et al., 2004.
Marsileaceae						
<i>Marsilea quadrifolia</i> L.	Partes aéreas	Malária			MeOH: 3,8 (W2)	Tran et al., 2003.

Família/Espécie	Parte da Planta	Uso popular	Compostos isolados (ativos)	Solvente de extração: percentual da atividade antimalárica <i>in vivo</i> e concentração (mg/Kg)	Solvente de extração: IC ₅₀ das plantas e composto antimaláricos (µg/ml) e (cepas testadas do <i>Plasmodium falciparum</i>) da atividade <i>in vitro</i>	Referências
Meliaceae						
<i>Azadirachta indica</i> A. Juss.	Cascas do caule	Febre e malária			CH ₂ Cl ₂ : 4,7 (W2)	Hout et al., 2006
<i>Cedrela salvadorensis</i>	Folhas				EtOH: 8,3 (D6)	MacKinnon et al., 1997.
<i>Chukrasia tabularis</i>	Folhas			MeOH: 33,3% (500)	CH ₂ Cl ₂ /MeOH: 3,5 (D10)	Clarkson et al., 2004. Muregi et al., 2007.
<i>Dysoxylum fraseranum</i>	Folhas				EtOH: 3,39 (W2)	MacKinnon et al., 1997.
<i>Entandrophragma angolense</i>	Casca do caule		24-metilenecicloartenol (26)		CH ₂ Cl ₂ /MeOH: 5,4 (W2)	Bickii et al., 2007
<i>Entandrophragma caudatum</i> Sprague	Cascas do caule				CH ₂ Cl ₂ : 2,90 (PfUP1)	Prozesky et al., 2001.
<i>Khaya anthotheca</i>	Raízes	Malária	Antotocol (37)		MeOH: 1,4 (W2)	Lee et al., 2008
<i>Khaya grandifoliola</i> C.D.C	Cascas do caule	Malária e febre	Metilangolensato (38) Gedunina (39) 7-diacetilchivorina (40) 1-diacetilchivorina (41) 6-acetilswietenolideo (42)		EtOH: 5,4 (D6) EtOH: 1,25 (D6) EtOH: 5,08 (D6) EtOH: 9,63 (D6) EtOH: 7,46 (D6)	Bickii et al., 2000. Bickii et al., 2000. Bickii et al., 2000. Bickii et al., 2000. Bickii et al., 2000.
<i>Swietenia macrophylla</i> King.	Cascas do caule	Malária e febre		EtOH: 73% (250)		Muñoz et al., 2000.
<i>Trichilia emetica</i> Vahl.	Cascas do caule	Doenças gastro- intestinais			CH ₂ Cl ₂ : 3,3 (PfUP1)	Prozesky et al., 2001.
<i>Triclisia gillettii</i> Staner.	Cascas do caule	Febre e reumatismo			MeOH: 2 (RPMI-1640)	Mesia et al., 2008.
<i>Trichilia glabra</i>	Cascas do caule				EtOH: 8,75 (D6)	MacKinnon et al., 1997.
<i>Trichilia hirta</i>	Folhas				EtOH: 10,3 (D6)	MacKinnon et al., 1997.
Menispermaceae						
<i>Abuta rufescens</i> Aubl.	Cascas do caule Folhas Tubérculo	Malária Febre e tônico Malária			CH ₂ Cl ₂ : 2,3 (FcB1) MeOH: 3,2 (FcB1) CH ₂ Cl ₂ : 1,0 (W2)	Roumy et al., 2007. Roumy et al., 2007. Hout et al., 2006.
<i>Burasaia madagascariensis</i> Thouars	Cascas do caule	Malária			EtOH: 1,7 (FMC29)	Rasoanaivo et al., 1999.
<i>Curarea tecunarium</i> Barneby <i>Stephania rotunda</i> Lour.	Caule Caule	Febre e asma	Dehidroeroemerina (7) Cefarantina (8)		EtOH: < 10 (3D7) CH ₂ Cl ₂ : 0,36 (W2) CH ₂ Cl ₂ : 0,61 (W2)	Kvist et al., 2006. Chea et al., 2007. Chea et al., 2007.
<i>Triclisia macrocarpa</i> Baillon	Cascas do caule				EtOH: 3 (FMC29)	Rasoanaivo et al., 1999.

Família/Espécie	Parte da Planta	Uso popular	Compostos isolados (ativos)	Solvente de extração: percentual da atividade antimalárica <i>in vivo</i> e concentração (mg/Kg)	Solvente de extração: IC ₅₀ das plantas e composto antimaláricos (µg/ml) e (cepas testadas do <i>Plasmodium falciparum</i>) da atividade <i>in vitro</i>	Referências
Memnispemaceae						
<i>Coscinium fenestratum</i> Gaertn.	Caule	Malária			MeOH: 0,5 (W2)	Tran et al., 2003.
<i>Tinospora cordifolia</i> Miers	Caule	Malária			MeOH/H ₂ O: 3,2 (W2)	Tran et al., 2003.
<i>Tinospora crispa</i> Miers	Caule	Malária			MeOH: 7,5 (W2)	Tran et al., 2003.
Mimosaceae						
<i>Acacia xanthoploea</i> Benth.	Cascas do caule	Malária e anemia			CH ₃ COCH ₃ : 10,1 (PfUP1)	Prozesky et al., 2001.
<i>Albizia gummifera</i> J.F. Gmel.	Cascas do caule	Malária e escabiose		MeOH: 31,7% (500)		Muregi et al., 2007.
<i>Mimosa pudica</i> L.	Partes aéreas	Malária			MeOH: 4 (W2)	Tran et al., 2003.
<i>Schrankia leptocarpa</i> DC.	Partes aéreas	Febre e hipertensão			CHCl ₃ : 1,6 (RPMI 1640)	Weniger et al., 2004.
Moraceae						
<i>Ficus sycomorus</i> L.	Folhas/Caule	Malária			MeOH: > 10 (W2)	Sanon et al., 2003.
<i>Ficus sur</i> Forssk.	Raízes	Estomatite		MeOH: 48,8% (500)		Muregi et al., 2003.
<i>Maclura tinctoria</i> L.	Folhas				EtOH/H ₂ O: > 10 (F32)	Bourdy et al., 2004.
<i>Maquira coriacea</i> Karst.	Cascas do caule	Malária e Febre		EtOH/H ₂ O: 36% (100)		Muñoz et al., 2000.
Monimiaceae						
<i>Siparuna andina</i> Tul.	Folhas				EP/AcOEt: 3 (PoW)	Jenett-Siems et al., 1999.
<i>Siparuna pauciflora</i> Beurl.	Folhas				EP/AcOEt: 8,2 (PoW)	Jenett-Siems et al., 1999.
Myricaceae						
<i>Myrica salicifolia</i> A.Rich.	Cascas das raízes	Malaria			H ₂ O: 51,07 (D10) H ₂ O: 66,84 (3D7)	Muthaura et al., 2007. Kirira et al., 2006.
Myristicaceae						
<i>Iryanthera laevis</i> Mkgf.	Cascas do caule	Lesões		EtOH/H ₂ O: 59% (100)		Muñoz et al., 2000.
<i>Virola calophylla</i> Warb.	Cascas do caule	Fungicida e malária			CH ₂ Cl ₂ : 4,3 (FcB1)	Roumy et al., 2007.
Myrsinaceae						
<i>Maesa lanceolata</i> Forssk.	Folhas	Artrose			CHCl ₃ : 1,6 (RPMI 1640)	Katuura et al., 2007.
Myrtaceae						
<i>Syzygium cordatum</i> Hochst	Galhos				CH ₂ Cl ₂ /MeOH: 10 (D10)	Clarkson et al., 2004.
Nyctagynaceae						
<i>Boerhaavia erecta</i> L.	Cascas do caule	Malária		H ₂ O: 45,6% (400)		Hilou et al., 2006.
Oleaceae						
<i>Minquartia guianensis</i> Aublet	Cortex				EtOH: < 10 (3D7)	Kvist et al., 2006.
<i>Olea europaea</i> L.	Cascas do caule	Antipirética			H ₂ O: 9,48 (D6)	Muthaura et al., 2007.
<i>Ximenia americana</i> L.	Cascas do caule	Anti-inflamatório			EtOH/H ₂ O: > 10 (F32)	Bourdy et al., 2004.

Família/Espécie	Parte da Planta	Uso popular	Compostos isolados (ativos)	Solvente de extração: percentual da atividade antimalárica <i>in vivo</i> e concentração (mg/Kg)	Solvente de extração: IC ₅₀ das plantas e composto antimaláricos (µg/ml) e (cepas testadas do <i>Plasmodium falciparum</i>) da atividade <i>in vitro</i>	Referências
Pandaceae						
<i>Microdemis puberula</i> Hoof.	Folhas	Diarréia e úlceras			MeOH: 9 (RPMI-1640)	Mesia et al., 2008.
Papaveraceae						
<i>Argemone subfusiformis</i> Ownb.	Partes aéreas	Malária			EtOH/H ₂ O: 4,4 (F32)	Bourdy et al., 2004.
Papilionaceae						
<i>Indigofera emerginella</i> Steud.	Folhas	Helmintismo			EtOH: 5,8 (RPMI 1640)	Katuura et al., 2007.
Passifloraceae						
<i>Adenia lobata</i> Engl.	Caule	Tripanosomiase			CHCl ₃ : 1,5 (FcB1)	Okpekon et al., 2004.
Pedaliaceae						
<i>Harpagophytum procumbens</i> DC.	Raízes		8, 11, 13, Abietatrien-12-ol (31) 8,11,13-totaratrien-12-13-diol (32)		EP: 1 (K1) EP: 1 (K1)	Clarkson et al., 2003 Clarkson et al., 2003
Periplocaceae						
<i>Cryptolepis sanguinolenta</i> Lindl.	Cascas das raízes			EtOH: 75,07% (400)		Tona et al., 1999.
Phytolaccaceae						
<i>Gallesia integrifolia</i> Harms	Folhas	Escabiose e anemia		EtOH: 31% (775)		Muñoz et al., 2000.
<i>Petiveria alliaceae</i> Kunth and Bsache	Partes aéreas	Febre		EtOH: 41% (1000)		Muñoz et al., 2000.
Piperaceae						
<i>Piper capense</i> L.f.	Partes aéreas	Diarréia			CH ₂ Cl ₂ : 7 (W2)	Kaou et al., 2008.
<i>Piper hispidum</i> Sw.	Folhas	Malária			EP/AcOEt: 7,6 (PoW)	Jenett-Siems et al., 1999.
<i>Piper hostmannianum</i>	Folhas		Hostmanina A (60) Hostmanina C (61) Hostmanina D (62) 2'-6'-Dihidroxi-40-metoxi- dihidrochalcona (63) Linderatona (64) Estrobopinina (65) Adunctina E (66) (-)-Metil-linderatina (67)		C ₆ H ₁₄ /AcOEt: 101,27 µM (F32) C ₆ H ₁₄ /AcOEt: 68,4 µM (F32) C ₆ H ₁₄ /AcOEt: 55,44 µM (F32) C ₆ H ₁₄ /AcOEt: 12,69 µM (F32) C ₆ H ₁₄ /AcOEt: 10,33 µM (F32) C ₆ H ₁₄ /AcOEt: 168,52 µM (F32) C ₆ H ₁₄ /AcOEt: 126,75 µM (F32) C ₆ H ₁₄ /AcOEt: 5,64 µM (F32)	Portet et al., 2007. Portet et al., 2007. Portet et al., 2007. Portet et al., 2007. Portet et al., 2007. Portet et al., 2007. Portet et al., 2007. Portet et al., 2007.
<i>Piper peltatum</i> L.	Partes aéreas	Furunculose		EtOH: 47% (854)		Muñoz et al., 2000.
Plumbaginaceae						
<i>Plumbago zeylanica</i> L.	Folhas				CH ₂ Cl ₂ : 3 (D10)	Clarkson et al., 2004.
Poaceae						
<i>Cymbopogon validus</i> (Stapf)	Planta inteira				CH ₂ Cl ₂ /MeOH: 5,8 (D10)	Clarkson et al., 2004.
Polygalaceae						
<i>Ruprechtia triflora</i> Griseb	Folhas Cascas do caule				EtOH/H ₂ O: > 10 (F32) EtOH/H ₂ O: > 10 (F32)	Bourdy et al., 2004. Bourdy et al., 2004.
<i>Securidaca longipedunculata</i> Fresen	Folhas	Reumatismo e malária			CH ₂ Cl ₂ : 6,9 (3D7)	Bah et al., 2007.

Família/Espécie	Parte da Planta	Uso popular	Compostos isolados (ativos)	Solvente de extração: percentual da atividade antimalárica <i>in vivo</i> e concentração (mg/Kg)	Solvente de extração: IC ₅₀ das plantas e composto antimaláricos (µg/ml) e (cepas testadas do <i>Plasmodium falciparum</i>) da atividade <i>in vitro</i>	Referências
Polygonaceae						
<i>Polygonum multiflorum</i> Thunb	Raízes	Malária			MeOH: 3,4 (W2)	Tran et al., 2003.
<i>Triplaris americana</i> L.	Cascas do caule			EtOH: 93% (350)		Muñoz et al., 2000.
Ptaeroxylaceae						
<i>Ptaeroxylon obliquum</i> (Thunb.)	Caule				CH ₂ Cl ₂ /MeOH: 5,5 (D10)	Clarkson et al., 2004.
Ranunculaceae						
<i>Clematis brachiata</i> Thunb	Raízes	Malaria e esquistossomose			H ₂ O: 1,5 (D6)	Muthaura et al., 2007.
<i>Ranunculus multifidus</i> Forssk	Planta inteira				CH ₂ Cl ₂ /MeOH: 2,3 (D10)	Clarkson et al., 2004.
Rhamnaceae						
<i>Rhamnus prinoides</i> L.	Cascas das raízes	Malária e pneumonia			H ₂ O: 3,53 (D6)	Muthaura et al., 2007.
<i>Rhamnus staddo</i> A. Rich	Raízes	Malaria		MeOH: 44% (500)	H ₂ O: > 10 (K39)	Muregi et al., 2007.
<i>Zizyphus cambodiana</i> Pierre	Caule	Febre		MeOH: 48,1% (500)		Muregi et al., 2007.
<i>Zizyphus mistol</i> Griseb.	Folhas Cascas do caule				EtOH/H ₂ O: > 10 (F32) EtOH/H ₂ O: > 10 (F32)	Hout et al., 2006. Bourdy et al., 2004.
<i>Zizyphus mucronata</i> Willd.	Cascas do caule				CH ₃ COCH ₃ : 4,13 (PfUP1)	Prozesky et al., 2001.
Rhizophoraceae						
<i>Rhizophora mucronata</i> Lam.	Galhos				CH ₂ Cl ₂ /MeOH: 5,6 (D10)	Clarkson et al., 2004.
Rosaceae						
<i>Prunus amplifolia</i> Pilger	Cascas do caule	Reumatismo		EtOH/H ₂ O: 66% (250)		Muñoz et al., 2000.
Rubiaceae						
<i>Boscia angustifolia</i> A.	Cascas do caule	Malária			H ₂ O: > 10 (D6)	Muthaura et al., 2007.
<i>Canthium setosum</i> Hiern.	Partes aéreas	Malária			CHCl ₃ : 2,77 (3D7)	Weniger et al., 2004.
<i>Cinchona calisaya</i>	Casca do caule	Malária		EtOH: 91% (250)	EtOH: 0,2 (D2)	Deharo et al., 2001.
<i>Cinchona succirubra</i> Pav.	Cascas do caule				EtOH: < 10 (Dd2)	De Madureira et al., 2002.
<i>Crossopteryx febrifuga</i> Benth	Folhas	Malária			MeOH: > 10 (W2)	Sanon et al., 2003.
<i>Fadogia agrestis</i> Schweinf.	Folhas	Malária			MeOH: > 10 (W2)	Sanon et al., 2003.
<i>Gardenia saxatilis</i> Geddes	Partes aéreas	Malária	Ácido Massagenico A (27) Ácido Massagenico B (28) Ácido Uncarinico E (29) Ácido 27- <i>p</i> -(E) coumaroilixiursólico (30)		CHCl ₃ : 1,5 (K1) CHCl ₃ : 3,8 (K1) CHCl ₃ : 3 (K1)	Suksamrarn et al., 2003. Suksamrarn et al., 2003. Suksamrarn et al., 2003.
					CHCl ₃ : 3 (K1)	Suksamrarn et al., 2003.
<i>Morinda lucida</i> Benth.	Cascas do caule Folhas Folhas	Febre e malária		CH ₂ Cl ₂ : 67,5 %(200) CH ₂ Cl ₂ : 97,7 %(200)	EtOH: < 10 (Dd2) CH ₂ Cl ₂ : 5,2 (K1) CH ₂ Cl ₂ : 3,1 (K1)	De Madureira et al., 2002. Cimanga et al., 2006 Cimanga et al., 2006
			Ácido ursólico (33)			

Família/Espécie	Parte da Planta	Uso popular	Compostos isolados (ativos)	Solvente de extração: percentual da atividade antimalárica <i>in vivo</i> e concentração (mg/Kg)	Solvente de extração: IC ₅₀ das plantas e composto antimaláricos (µg/ml) e (cepas testadas do <i>Plasmodium falciparum</i>) da atividade <i>in vitro</i>	Referências
Rubiaceae (continuação)						
<i>Nauclea latifolia</i> Sm.	Cascas do caule	Malária			EtOH: 9 (FcB1)	Zirihi et al., 2005.
	Raízes				H ₂ O: 0,9 (FcB1)	Benoit-Vical et al., 1998.
<i>Nauclea officinalis</i>	Casca do caule	Malária			CHCl ₃ /MeOH: 9,7 (FCC1)	Sun et al., 2008.
<i>Pavetta corymbosa</i> (DC.)	Partes aéreas				CHCl ₃ : 5,54 (K1)	Weniger et al., 2004.
<i>Sabicea villosa</i> Willd.	Partes aéreas	Malária			C ₆ H ₁₄ : 5,3 (FcB1)	Roumy et al., 2007.
<i>Remijia peruviana</i> Standl.	Córtex	Febre			EtOH: < 10 (3D7)	Kvist et al., 2006.
	Cascas do caule				EtOH/H ₂ O: 0,85 (F32)	Bourdy et al., 2004.
<i>Vangueria infausta</i>	Cascas das raízes	Malária			CHCl ₃ : 3,8 (D6)	Abosi et al., 2006.
Rutaceae						
<i>Agathosma apiculata</i> G. Mey.	Planta inteira	Febre e diarreia			CH ₂ Cl ₂ /MeOH: 5,2 (D10)	Clarkson et al., 2004.
<i>Citrus limon</i> L.	Raízes	Malaria			EtOH: <10 (3D7)	Kvist et al., 2006.
<i>Diosma</i> sp.	Raízes				CH ₂ Cl ₂ : 10 (D10)	Clarkson et al., 2004.
<i>Fagara macrophylla</i> Oliv.	Cascas do caule	Malaria			EtOH: 2,3 (FcB1)	Zirihi et al., 2005.
<i>Fagaropsis angolensis</i> Dale	Casca do caule	Malaria			H ₂ O: 6,13 (NF54)	Kirira et al., 2006.
<i>Macrostylis squarrosa</i> Bartl.	Caule	Febre			CH ₂ Cl ₂ /MeOH: 10 (D10)	Clarkson et al., 2004.
<i>Toddalia asiática</i> L.	Cascas das raízes			MeOH: 59,3% (500)	EtOH: 5 (D6)	Muthaura et al., 2007.
	Raízes					Muregi et al., 2007.
<i>Vepris macrophylla</i> Verdoorn	Raízes	Pneumonia	Metil-urgenenoato (36)		CH ₂ Cl ₂ : 10 (3D7)	Cheplogoi et al., 2008.
<i>Zanthoxylum chalybeum</i> Engl.	Casca do caule	Malaria			H ₂ O: 1,2 (KI)	Muthaura et al., 2007.
<i>Zanthoxylum usambarense</i>		Febre e malária	Hidróxido-Nitidina (9) Hidróxido-Avicina (10)		CH ₂ Cl ₂ : <0,1 (FCB1) CH ₂ Cl ₂ : 4,3 (FCB1)	Jullian et al., 2006. Jullian et al., 2006.
Salicaceae						
<i>Salix humboldtiana</i> Willd.	Córtex				EtOH: < 10 (3D7)	Kvist et al., 2006.
Sapindaceae						
<i>Cupania vernalis</i> Camb.	Folhas	Anti-inflamatória			C ₆ H ₁₄ : 0,9 (FcB1)	De Mesquita et al., 2007.
<i>Hippobromus pauciflorus</i> L.	Galhos	Malaria			CH ₂ Cl ₂ /MeOH: 5,9 (D10)	Clarkson et al., 2004.
<i>Magonia pubescens</i> St. Hil.	Folhas				EtOH: 10 (FcB1)	De Mesquita et al., 2007.
<i>Matayba guianensis</i> Aublet	Raízes	Antiplasmodial			C ₆ H ₁₄ : 6,1 (FcB1)	De Mesquita et al., 2007.
<i>Serjania deltóidea</i> Radek	Partes aéreas	Piscicida		EtOH: 44% (1000)		Muñoz et al., 2000.

Família/Espécie	Parte da Planta	Uso popular	Compostos isolados (ativos)	Solvente de extração: percentual da atividade antimalárica <i>in vivo</i> e concentração (mg/Kg)	Solvente de extração: IC ₅₀ das plantas e composto antimaláricos (µg/ml) e (cepas testadas do <i>Plasmodium falciparum</i>) da atividade <i>in vitro</i>	Referências
Scrophulariaceae						
<i>Capraria biflora</i> L.	Partes aéreas				EtOH/H ₂ O: >10 (F32)	Bourdy et al., 2004.
Simaroubaceae						
<i>Brucea javanica</i> L.	Raízes Frutos	Antihelmintico e malária			CH ₂ Cl ₂ : 1 (W2) MeOH: 0,5 (K1)	Hout et al., 2006. O'Neil et al., 1987.
<i>Castela coccinea</i> Griseb.	Folhas Frutas Casca do caule	Diarréia e desinteria			EtOH/H ₂ O: 0,37 (F32) EtOH/H ₂ O: 3,7 (F32) EtOH/H ₂ O: 3,25 (F32)	Bourdy et al., 2004. Bourdy et al., 2004. Bourdy et al., 2004.
<i>Eurycoma longifolia</i> Jack	Casca do caule	Febre e reumatismo	Euricomolactona (43) 9-Metoxicantina-6-ona (17) Euricomanaona (44) 13,21-Dihidro euricomanaona (45) 14,15,β-Dihidroxiclaianeona (46) 13α(21)-Epoieuricomanaona (47) Euricomanol (48)		C ₄ H ₉ OH: 0,67 (W2) C ₄ H ₉ OH: 0,91 (W2) C ₄ H ₉ OH: 0,04 (W2) C ₄ H ₉ OH: 0,67 (W2) C ₄ H ₉ OH: 0,05 (W2) C ₄ H ₉ OH: 0,80 (W2) C ₄ H ₉ OH: 0,05 (W2)	Chan et al., 2004. Chan et al., 2004. Chan et al., 2004. Chan et al., 2004. Chan et al., 2004. Chan et al., 2004. Chan et al., 2004.
<i>Hannoa klaineuna</i>	Casca do caule	Febre e malária			MeOH: 0,67 (NF54)	François et al., 1998.
<i>Hannoa chlorantha</i>	Raízes	malária	Chaparrinona (49) 14-Hidroxichaparrinona (50) 15- Desacetilundulatona (51) 6-α-Tigloiloxiglaucarubol (52)		MeOH: 0,04 (NF54) MeOH: 0,18 (NF54) MeOH: 0,05 (NF54) MeOH: 0,26 (NF54)	François et al., 1998. Francois et al., 1998. Francois et al., 1998. Francois et al., 1998.
<i>Harrisonia abyssinica</i> Oliv.	Raízes	Malaria			CH ₂ Cl ₂ : 6,0 (W2)	Hout et al., 2006.
<i>Picrolemma sprucei</i> Hook.f	Raízes	Febre e malária	Neosergeolideo(53)		CHCl ₃ /EtOH: 0,001 (K1)	Andrade-Neto et al., 2007.
Siparunaceae						
<i>Siparuna guianensis</i> Aubl.	Folhas	Febre			EtOH: 6,7 (K1)	Fischer et al., 2004.
Solanaceae						
<i>Cyphomandra hartwegii</i> Miers.	Casca do caule	Febre			CH ₂ Cl ₂ : 10 (FcB1)	Roumy et al., 2007.
<i>Physalis angulata</i> Linn.	Planta inteira	Malaria			EtOH: 8 (FcB1)	Zirihi et al., 2005.
<i>Solanum argentinum</i> Bitter	Folhas	Escabiose e reumatismo			EtOH/H ₂ O: 0,42 (F32)	Bourdy et al., 2004.
<i>Solanum mammosum</i> L.	Frutos			EtOH: 62% (814)		Muñoz et al., 2000.
<i>Solanum panduriforme</i> E. Mey.	Folhas				CH ₃ COCH ₃ : 3,62 (PfUP1)	Prozesky et al., 2001.

Família/Espécie	Parte da Planta	Uso popular	Compostos isolados (ativos)	Solvente de extração: percentual da atividade antimalárica <i>in vivo</i> e concentração (mg/Kg)	Solvente de extração: IC ₅₀ das plantas e composto antimaláricos (µg/ml) e (cepas testadas do <i>Plasmodium falciparum</i>) da atividade <i>in vitro</i>	Referências
Sphaerosepalaceae						
<i>Rhopalocarpus lucidus</i> Bojer	Partes aéreas				CHCl ₃ : 10 (FMC29)	Rasoanaivo et al., 1999.
Sterculiaceae						
<i>Hermannia depressa</i> N.E.Br.	Planta inteira				CH ₂ Cl ₂ /MeOH: 6,9 (D10)	Clarkson et al., 2004.
Tiliaceae						
<i>Triumfetta semitriloba</i> Jacq.	Folhas			EtOH: 57% (850)		Muñoz et al., 2000.
<i>Triumfetta welwitschii</i> Mast.	Folhas				CH ₂ Cl ₂ /MeOH: 3,6 (D10)	Clarkson et al., 2004.
Ulmaceae						
<i>Celtis spinosa</i> Spreng.	Folhas				EtOH/H ₂ O: >10 (F32)	Bourdy et al., 2004.
<i>Guazuma ulmifolia</i> Lam.	Folhas				EtOH/H ₂ O: >10 (F32)	Bourdy et al., 2004.
<i>Trema micrantha</i> L.	Cascas do caule			EtOH: 81% (100)		Muñoz et al., 2000.
Verbenaceae						
<i>Aloysia virgata</i> (Ruiz & Pavón)	Folhas				EtOH/H ₂ O: >10 (F32)	Bourdy et al., 2004.
<i>Clerodendrum myricoides</i> Hochst. Vatke	Cascas das raízes	Malaria e doenças venerias		MeOH: 31,7% (500)	H ₂ O: 8,5 (K39)	Muthaura et al., 2007. Muregi et al., 2007.
<i>Lantana camara</i> L.	Folhas/galhos				CH ₂ Cl ₂ /MeOH: 10 (D10)	Clarkson et al., 2004.
<i>Lippia javanica</i> Burm.	Raízes Folhas	Febre			CH ₂ Cl ₂ : 3,8 (D10) CH ₃ OCH ₃ : 4,26 (PfUP1)	Clarkson et al., 2004. Prozesky et al., 2001.
<i>Lippia multiflora</i> Moldenke	Folhas	Hipertensão e malária			CHCl ₃ : 7,3 (FcB1)	Okpekon et al., 2004.
Vitex rehmannii	Folhas	Estomatite	(12S,16S)-(12S,16R) – diidroxi-ent-labda-7,13-dien-15,16-olideo (35)			
Violaceae						
<i>Hybanthus enneaspermus</i> L.	Partes aéreas	Infecção urinária e vermenose			CHCl ₃ : 2,57 (K1)	Weniger et al., 2004.
Zingiberaceae						
<i>Aframomum sceptrum</i> Oliv.	Folhas	Desinteria			CHCl ₃ : 8,1 (FcB1)	Okpekon et al., 2004.
<i>Curcuma longa</i> L.	Bulbo	Hlmintismo			EtOH: <10 (3D7)	Kvist et al., 2006.

REFERÊNCIA

Abosi AO, Mbukwa ET, Majinda RR, Raseroka BH, Yenesew A, Midiwo JO, Akala H, Liyala P, Waters NC 2006. *Vangueria infausta* root bark: *in vivo* and *in vitro* antiplasmodial activity. *Br J Biomed Sci.* 63: 129-133.

Addae-Kyereme J, Croft SL, Kendrick H, Wright CW 2001. Antiplasmodial activities of some Ghanaian plants traditionally used for fever/malaria treatment and of some alkaloids isolated from *Pleiocarpa mutica*; *in vivo* antimalarial activity of pleiocarpine; *J Ethnopharmacol.* 76: 99–103.

Albuquerque UP, Hanazaki N 2006. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. *Rev Bras Farmacogn* 16: 678-689.

Almeida MMB, Arriga AMC, Dos Santos AKL, Lemos TLG, Braz-Filho R, Vieira IJC 2007. Ocorrência e atividade biológica de quassinóides da última década. *Quím. Nova* 30: 935-951.

Ancolio C, Azas N, Mahiou V, Ollivier E, Di Giorgio C, Keita A, Timon-David P, Balansard G 2002. Antimalarial activity of extracts and alkaloids isolated from six plants used in traditional medicine in Mali and São Tomé. *Phytother Res* 16: 646-649.

Andrade-Neto VF, Pohlit AM, Pinto ACS, Silva ECC, Nogueira KL, Melo MRS, Henrique MV, Amorim RCN, Silva LFR, Costa MRF, Nunomura RCS, Nunomura SM, Alecrim WD, Alecrim MGC, Chaves FCM, Vieira PPR 2007. *In vitro* inhibition of *Plasmodium falciparum* by substances isolated from Amazonian antimalarial plants. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 102: 359-365.

Bandeira PN, Lemos TLG, Costa SMO, Dos Santos HS 2007. Obtenção de derivados da mistura triterpenoídica α - e β -amirina. *Rev Bras Farmacogn* 17: 204-208.

Bah S, Jäger AK, Adersen A, Diallo D, Paulsen BS 2007. Antiplasmodial and GABA_A-benzodiazepine receptor binding activities of five plants used in traditional medicine in Mali, West Africa; *J Ethnopharmacol* 110: 451–457.

Banzouzi JT, Prado R, Menan H, Valentin H, Roumestan C, Mallié M, Pelissier Y, Blache Y 2004. Studies on medicinal plants of Ivory Coast: Investigation of *Sida acuta* for *in vitro* antiplasmodial activities and identification of an active constituent; *Phytomedicine* 11: 338–341.

Benoit-Vical F, Imbert C, Bonfils JP, Sauvaire Y 2003. Antiplasmodial and antifungal activities of iridal, a plant triterpenoid. *Phytochem* 62: 747–751.

Benoit-Vical F, Valentin A, Cournac V, Pélissier Y, Mallié M, Bastide JM 1998. *In vitro* antiplasmodial activity of stem and root extracts of *Nauclea latifolia* S.M. (Rubiaceae); *J Ethnopharmacol*. 61: 173–178.

Bickii J, Njifutie N, Foyere JA, Basco LK, Ringwald P 2000. *In vitro* antimalarial activity of limonoids from *Khaya grandifoliola* C.D.C. (Meliaceae); *J Ethnopharmacol* 69: 27–33.

Bourdy G, Oporto P, Gimenez A, Deharo E 2004. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach Part VI. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by Isoceño-Guaraní Indians. *J Ethnopharmacol* 93: 269–277.

Brasil 1999. Congresso Nacional. *Lei no. 9.782, de 26 de janeiro de 1999*. Define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e dá outras providências. DOU. Poder Legislativo, Brasília, DF, 27 jan. 1999.

Campbell WE, Nair JJ, Gammon DW, Codina C, Bastida J, Viladomat F, Smith PJ, Albrecht CF 2000. Bioactive alkaloids from *Brunsvigia radulosa*. *Phytochem* 53: 587-591.

Carvalho LH, Rocha EMM, Raslan DS, Oliveira AB, Krettli AU 1988. *In vitro* activity of natural and synthetic naphthoquinones against erythrocytic stages of *P. Falciparum*. *Braz J Med Biol Resid* 21: 485-487.

Carvalho ACB, Balbino EE, Maciel A, Perfeito, JPS 2008. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. *Rev Bras Farmacogn* 18: 314-319.

Chan KL, Choo CY, Abdullah NR, Ismail Z 2004. Antiplasmodial studies of *Eurycoma longifolia* Jack using the lactate dehydrogenase assay of *Plasmodium falciparum*. *J Ethnopharmacol* 92: 223–227.

Chea A, Hout S, Bun SS, Tabatadze N, Gasquet M, Azas N, Elias R, Balansard G 2007. Antimalarial activity of alkaloids isolated from *Stephania rotunda*; *J Ethnopharmacol* 112: 132–137.

Cheplogoi PK, Mulholland DA, Coombes PH, Randrianarivelojosia M 2008. An azole, an amide and a limonoid from *Vepris uguenensis* (Rutaceae). *Phytochem* 69: 1384–1388.

Cimanga RK, Tona GL, Mesia GK, Kambu OK, Bakana DP, Kalenda PDT, Penge AO, Muyembe JJT, Totte J, Pieters L, Vlietinck AJ 2006. Bioassay-guided isolation of antimalarial triterpenoid acids from the leaves of *Morinda lucida*. *Pharm Biol* 44: 677-681.

Clarkson C, Maharaj VJ, Crouch NR, Grace OM, Pillay P, Matsabisa MG, Bhagwandin N, Smith PJ, Folb PI 2004. *In vitro* antiplasmodial activity of medicinal plants native to or naturalised in South Africa. *J Ethnopharmacol* 92: 177–191.

Clarkson C, Campbell WE, Smith P 2003. *In vitro* antiplasmodial activity of abietane and totarane diterpenes isolated from *Harpagophytum procumbens* (Devil's Claw). *Planta Med* 69: 720-724.

Debenedetti S, Muschietti L, Van Baren C, Clavin M, Broussalis A, Martino V, Houghton PJ, Warhurst D, Steele J 2002. *In vitro* antiplasmodial activity of extracts of Argentinian plants. *J Ethnopharmacol* 80: 163-166.

Deharo E, Bourdy G, Quenevo C, Muñoz V, Ruiz G, Sauvain M 2001. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. Part V. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by the Tacana Indians. *J Ethnopharmacol* 77: 91–98.

De Madureira MC, Martins AP, Gomes M, Paiva J, Cunha AP, Do Rosário V 2003. Antimalarial activity of medicinal plants used in traditional medicine in S. Tomé and Príncipe islands. *J Ethnopharmacol* 81: 23-29.

De Mesquita ML, Grellier P, Mambu L, De Paula JE, Espindola LS 2007. *In vitro* antiplasmodial activity of Brazilian Cerrado plants used as traditional remedies. *J Ethnopharmacol*. 110: 165–170.

Desjardins RE, Canfield CJ, Hynes JD, Chulay JD 1979. Quantitative assessment of antimalarial activity *in vitro* by a semi-automated microdilution technique. *Antimicrob Agents Chemother* 16: 710-718.

Dhar R, Zhang K, Talwar GP, Gerg S, Kumar N 1998. Inhibition of the growth and development of asexual and sexual stages of drug-sensitive and resistant strains of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* by Neem (*Azadirachta indica*) fractions. *J Ethnopharmacol* 61: 31-39

Dhingra V, Rao KV, Narasu LM 2000. Current status of artemisinin and its derivatives as antimalarial drugs. *Life Sci* 66: 279-300.

Fischer DCH, Gualda NCA, Bachiega D, Carvalho CS, Lupo FN, Bonotto SV, Alves MO, Yogi A, Di Santi SM, Avila PE, Kirchgatter K, Moreno PRH 2004. *In vitro* screening for antiplasmodial activity of isoquinoline alkaloids from Brazilian plant species. *Acta Trop* 92: 261–266.

França TCC, Dos Santos MG, Figueroa-Vilar JD 2008. Malária: aspectos históricos e quimioterapia. *Quím. Nova* 31: 1271-1278.

François G, Diakanamw C, Timpman G, Bringmann G, Steenackers T, Atassi G, Looveren MV, Holenz J, Tassin JP, Assi LA, Vanhaelen-Fastré R, Vanhaelen M 1998. Antimalarial and

cytotoxic potential of four quassinoids from *Hannoa chlorantha* and *Hannoa klaineana*, and their structure-activity relationships. *Int J Parasitol* 28: 635-640.

François G, Assi LA, Holenz J, Bringmann G 1996. Constituents of *Picralima nitida* display pronounced inhibitory activities against asexual erythrocytic forms of *Plasmodium falciparum* in vitro. *J Ethnopharmacol* 54: 113-117.

Fotie J, Bohle DS, Leimanis ML, Georges E, Rukunga G, Nkengfack AE 2006. Lupeol long-chain fatty acid esters with antimalarial activity from *Holarrhena floribunda*. *J Nat Prod* 69: 62-67.

Hay AE, Hélesbeux JJ, Duvala O, LabaRed ML, Grellier P, Richomme P 2004. Antimalarial xanthenes from *Calophyllum caledonicum* and *Garcinia vieillardii*. *Life Sci* 75: 3077–3085.

He ZD, Ma CY, Tan GT, Sydara K, Tamez P, Southavong B, Bouamanivong S, Soejarto DD, Pezzuto JM, Fong HHS, Zhang HJ 2006. Rourinoside and rouremin, antimalarial constituents from *Rourea minor*. *Phytochem* 67: 1378–1384.

Hilou A, Nacoulma OG, Guiguemde TR 2006. *In vivo* antimalarial activities of extracts from *Amaranthus spinosus* L. and *Boerhaavia erecta* L. in mice. *J Ethnopharmacol* 103: 236–240.

Hout S, Chea A, Bun SS, Elias R, Gasquet M, Timon-David P, Balansard G, Azas N 2006. Screening of selected indigenous plants of Cambodia for antiplasmodial activity. *J Ethnopharmacol* 107: 12–18.

Jenett-Siems K, Mockenhaupt FP, Bienzle U, Gupta MP, Eich E 1999. *In vitro* antiplasmodial activity of Central American medicinal plants. *Trop Med Int Health* 4: 611–615.

Jullian V, Bourdy G, Georges S, Maurel S, Sauvain M 2006. Validation of use of a traditional antimalarial remedy from French Guiana, *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. *J Ethnopharmacol* 106: 348–352.

Kamatoua GPP, Van-Zyl RL, Davids H, Van-Heerden FR, Lourens ACU, Vijoer AM 2008. Antimalarial and anticancer activities of selected South African *Salvia* species and isolated compounds from *S. radula*. *S Afr J Bot* 74: 238-243.

Kaou AM, Mahiou-Leddert V, Hutter S, Ainouddine S, Hassani S, Yahaya I, Azas N, Ollivier E 2008. Antimalarial activity of crude extracts from nine African medicinal plants. *J Ethnopharmacol* 116: 74–83.

Karou D, Dicko MH, Sanon S, Simporé J, Traore AS 2003. Antimalarial activity of *Sida acuta* Burm. (Malvaceae) and *Pterocarpus erinaceus* Poir. (Fabaceae). *J Ethnopharmacol* 89: 291–294.

Katuura E, Waako P, Tabuti JRS, Bukenya-Ziraba R, Ogwal-Okeng J 2007. Antiplasmodial activity of extracts of selected medicinal plants used by local communities in western Uganda for treatment of malaria. *Afr J Ecol* 45: 94–98.

Kaur K, Jain M, Kaur T, Jain R 2009. Antimalarials from nature. *Bioorg Med Chem* 17: 3229-3256.

Kayser O, Kiderlen AF, Croft SL 2003. Natural products as antiparasitic drugs. *Parasitol Res* 90: S55–S62

Kim YC, Kim HS, Wataya Y, Sohn DH, Kang TH, Kim MS, Kim WM, Lee GM, Chang JD, Park H 2004. Antimalarial activity of lavandulyl flavanones isolated from the roots of *Sophora flavescens*. *Biol Pharm Bull* 27: 748-750.

Kirby GC, Paine A, Warhurst DC, Noamese BK, Phillipson JD 1995. *In vitro* and *in vivo* antimalarial activity of cryptolepine, a plant-derived indoloquinoline. *Phytother Res* 9: 359–363.

Kirira PG, Rukunga GM, Wanyonyi AW, Muregi FM, Gathirwa JW, Muthaura CM, Omar S A, Tolo F, Mungai GM, Ndiege IO 2006. Anti-plasmodial activity and toxicity of extracts of plants used in traditional malaria therapy in Meru and Kilifi Districts of Kenya. *J Ethnopharmacol* 106: 403–407.

Krettli, AU 2009. Antimalarial drug discovery: screening of Brazilian medicinal plants and purified compounds. *Exp Op Drug Discov* 4: 95-108.

Kuria KAM, Chepkwony H, Govaerts C, Roets E, Busson R, De Witte P, Zupko I, Hoornaert G, Quirynen L, Maes L, Janssens L, Hoogmartens J, Laekeman G 2002. The antiplasmodial activity of isolates from *Ajuga remota*. *J Nat Prod* 65: 789-793.

Kvist LP, Christensen SB, Rasmussen HB, Mejia K, Gonzalez A 2006. Identification and evaluation of Peruvian plants used to treat malaria and leishmaniasis. *J Ethnopharmacol* 106: 390–402.

Lee SE, Kim MR, Kim JH, Takeoka GR, Kim TW, Perk BS 2008. Antimalarial activity of anthothecol derived from *Khaya anthotheca* (Meliaceae). *Phytomedicine* 15: 533-535.

Lenta BN, Ngouela S, Boyom FF, Tantangmo F, Tchouya GRF, Tsamo E, Gut J, Rosenthal PJ, Connolly JD 2007. Anti-plasmodial activity of some constituents of the root bark of *Harungana madagascariensis* LAM. (Hypericaceae). *Chem Pharm Bull* 55: 464-467.

Liu Y, Murakami N, Ji H, Abreu P, Zhang S 2007 Antimalarial flavonol glycosides from *Euphorbia hirta*. *Pharm Biol* 45: 278-281.

MacKinnon S, Durst T, Arnason JT 1997. Antimalarial activity of tropical meliaceae extracts and gedunin derivatives. *J Nat Prod* 60: 336-341.

Mesia GK, Tona GL, Nanga TH, Cimanga RK, Apers S, Cosc P, Maes L, Pieters L, Vlietinck AJ 2008. Antiprotozoal and cytotoxic screening of 45 plant extracts from Democratic Republic of Congo. *J Ethnopharmacol* 115: 409–415.

Muñoz V, Sauvain M, Bourdy G, Callapa J, Bergeron S, Rojas I, Bravo JA, Balderrama L, Ortiz B, Gimenez A, Deharo E 2000. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach Part I. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by the Chacobo Indians. *J Ethnopharmacol* 69: 127–137.

Muñoz V, Sauvain M, Bourdy G, Callapa J, Rojas I, Vargas L, Tae A, Deharo E 2000. The search for natural bioactive compounds through a multidisciplinary approach in Bolivia. Part II. Antimalarial activity of some plants used by Mosetene Indians. *J Ethnopharmacol* 69: 139–155.

Muregi FW, Ishih A, Miyase T, Suzuki T, Kino H, Amano T, Mkoji GM, Terada M 2007. Antimalarial activity of methanolic extracts from plants used in Kenyan ethnomedicine and their interactions with chloroquine (CQ) against a CQ-tolerant rodent parasite, in mice. *J Ethnopharmacol* 111: 190–195.

Muregi FW, Chhabra SC, Njagi ENM, Lang'at-Thoruwa CC, Njue WM, Orago ASS, Omar SA, Ndiege IO 2003. In vitro antiplasmodial activity of some plants used in Kisii, Kenya against malaria and their chloroquine potentiation effects. *J Ethnopharmacol* 84: 235-239.

Mustofa VA, Benoit-Vical F, Péliissier Y, Koné-Bamba D, Mallié M 2003. Antiplasmodial activity of plant extracts used in west African traditional medicine. *J Ethnopharmacol* 73: 145–151.

Muthaura, CN, Rukunga GM, Chhabra SC, Mungai GM, Njagi ENM 2007. Traditional phytotherapy of some remedies used in treatment of malaria in Meru district of Kenya. *S Afr J Bot* 73: 402–411.

Muthaura CN, Rukunga, GM, Chhabra SC, Omar SA, Guantai AN, Gathirwa JW, Tolo FM, Mwitari PG, Keter LK, Kirira PG, Kimani CW, Mungai GM, Njagi ENM 2007. Antimalarial activity of some plants traditionally used in treatment of malaria in Kwale district of Kenya. *J Ethnopharmacol* 112: 545–551.

Muthaura, CN, Rukunga GM, Chhabra SC, Mungai GM, Njagi ENM 2007. Traditional antimalarial phytotherapy remedies used by the Kwale community of the Kenyan Coast. *J Ethnopharmacol* 114: 377–386.

Narasu ML, Dhingra V, Rao KV 2000. Current status of artemisinin and its derivatives as antimalarial drugs. *Life Sci* 66: 279-300.

Ojo-Amaize EA, Nchekwube EJ, Cottam HB, Oyemade OA, Adesomoju AA, Okogun JI 2007. *Plasmodium berghei*: Antiparasitic effects of orally administered hypostoxide in mice. *Exp Parasitol* 117: 218–221.

Okokon JE, Antia BS, Igboasoii AC, Essien EE, Mbagwu HOC 2007. Evaluation of antiplasmodial activity of ethanolic seed extract of *Picralima nitida*. *J Ethnopharmacol* 111, 464–467.

Okpekon T, Yolou S, Gleye C, Roblot F, Loiseau P, Bories C, Grellier P, Frappier F, Laurens, A, Hocquemiller R 2004. Antiparasitic activities of medicinal plants used in Ivory Coast. *J Ethnopharmacol* 90: 91–97.

Olajide OA, Awe SO, Makinde JM 1999. Purgative effect of the methanol extract of *Morinda lucida*. *Fitoterapia* 70: 1-4.

O'Neill MJ, Bray DH, Boardman P, Chan KL, Hillipson JD 1987. Plants as sources of antimalarial drugs, part 4¹: activity of *brucea javanzca* fruits against in vitro and against chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* in vitro and against *Plasmodium berghei* in vivo. *J Nat Prod* 50: 41-48.

Peters W, Portus J, Robinson BL 1975. The chemotherapy of rodent malaria XXII. The value of drug resistant strains of *P. berghei* in screening for blood schizonticidal activity. *Ann Trop Med Parasitol* 69: 155–171.

Phillipson JD, Wright CW 1991. Can ethnopharmacology contribute to the development of antimalarial agents? *J Ethnopharmacol* 32: 155–165.

Portet B, Fabre N, Roumy V, Gornitzka H, Bourdy G, Chevalley S, Sauvian M, Valentin A, Moulis C 2007. Activity-guided isolation of antiplasmodial activity and cytotoxicity of ethnobotanical selected South African plants. *J Ethnopharmacol* 76: 239–245.

Portet B, Fabre N, Roumy V, Gornitzka H, Bourdy G, Chevalley S, Sauvain M, Valentin A, Moulis C 2007. Activity-guided isolation of antiplasmodial dihydrochalcones and flavanones from *Piper hostmannianum* var. *Berbicense*. *Phytochem* 68: 1312–1320.

Prozesky EA, Meyer JJM, Louw AI 2001. In vitro antiplasmodial activity and cytotoxicity of ethnobotanically selected South African plants. *J Ethnopharmacol* 76: 239–245.

Rahman NNNA, Furuta T, Kojima S, Takane K, Mohd MA 1999. Antimalarial activity of extracts of Malaysian medicinal plants. *J Ethnopharmacol* 64: 249–254.

Rasoanaivo P, Ratsimamanga-Urverg S, Ramanitrahasimbola D, Rafatro H, Rakoto-Ratsimamanga A 1999. Criblage d'extraits de plantes de Madagascar pour echerche d'activite' antipaludique et d'effet potentialisateur de la chloroquine. *J Ethnopharmacol* 64: 117–126.

Rayne S, Mazza G 2007. Biological activities of extracts from *Sumac* (*Rhus* spp.): A Review. *Plant Foods Hum Nut* 62: 165–175.

Roumy V, Garcia-Pizango G, Gutierrez-Choquevilc AL, Ruiz L, Jullian V, Winterton P, Fabre N, Moulis C, Valentin A 2007. Amazonian plants from Peru used by Quechua and Mestizo to treat malaria with evaluation of their activity. *J Ethnopharmacol* 112, 482–489.

Rukunga GM, Muregi FW, Tolo FM, Omar SA, Mwitari P, Muthaura CN, Omlin F, Lwande W, Hassanali A, Githure J, Iraqi FW, Mungai GM, Kraus W, Kofi-Tsekpo WM 2007. The antiplasmodial activity of spermine alkaloids isolated from *Albizia gummifera*. *Fitoterapia* 78: 455–459.

Sanon S, Ollivier E, Azas N, Mahiou V, Gasquet M, Ouattara CT, Nebie I, Traore AS, Esposito F, Balansard G, Timon-David P, Fumoux F 2003. Ethnobotanical survey and *in vitro* antiplasmodial activity of plants used in traditional medicine in Burkina Faso. *J Ethnopharmacol* 86: 143–147.

Simonsen HT, Nordskjold JD, Smitt UW, Nyman U, Palpu P, Joshi J, Varughese G 2001. *In vitro* screening of Indian medicinal plants for antiplasmodial activity. *J Ethnopharmacol* 74: 195–204.

Soh PN, Benoit-Vical, F 2007. Are West African plants a source of future antimalarial drugs? *J Ethnopharmacol* 114: 130–140.

Suksamrarn A, Tanachatchairatana T, Kanokmedhakul S 2003. Antiplasmodial triterpenes from twigs of *Gardenia saxatilis*. *J Ethnopharmacol* 88: 275–277.

Sun J, Lou H, Dai S, Xu H, Zhao F, Liu K 2008. Indole alkaloids from *Nauclea officinalis* with weak antimalarial activity. *Phytochem* 69: 1405–1410.

Tane P, Tene M, Sterner O 2002. Picranitine, a new indole alkaloid from *Picralima nitida* (Apocynaceae). *Bull Chem Soc Ethiopia* 16: 27-32.

Tona L, Cimanga RK, Mesia K, Musuamba CT, De Bruyne C, Apers S, Hernans N, Van Miert S, Pieters L, Totté J, Vlietinck AJ, 2004. *In vitro* antiplasmodial activity of extracts and fractions from seven medicinal plants used in the Democratic Republic of Congo. *J Ethnopharmacol* 93: 27–32.

Tona L, Ngimbi NP, Tsakala M, Mesia K, Cimanga K, Apers S, De Bruyne T, Pieters L, Totté J, Vlietinck AJ 1999. Antimalarial activity of 20 crude extracts from nine African medicinal plants used in Kinshasa, Congo. *J Ethnopharmacol* 68: 193–203.

Trager W, Jensen JB 1976. Human malaria parasites in continuous culture. *Science* 193: 673-675.

Tran QL, Tezuka Y, Ueda J, Nguyen NT, Maruyama Y, Begum K, Kim HS, Wataya Y, Tran KW, Kadota S 2003. *In vitro* antiplasmodial activity of antimalarial medicinal plants used in Vietnamese traditional medicine. *J Ethnopharmacol* 86: 249–252.

Vonthron-Sénécheau C, Weniger B, Ouattara M, Bi FT, Kamenan A, Lobstein A, Brun R Anton R 2008. *In vitro* antiplasmodial activity and cytotoxicity of ethnobotanically selected Ivorian plants. *J Ethnopharmacol* 87: 221–225.

Zirihi GN, Mambu L, Guédé-Guina F, Bodo B, Grellier P 2005. *In vitro* antiplasmodial activity and cytotoxicity of 33 West African plants used for treatment of malaria. *J Ethnopharmacol* 98: 281–285.

Zhang HJ, Qiu SX, Tamez P, Tan GT, Aydogmus Z, Van Hung N, Cuong NM, Angerhofer C, Soejarto DD, Pezzuto JM, Fong HHS 2002. Antimalarial agents from plants - II. Decursivine, a new antimalarial indole alkaloid from *Rhaphidophora decursiva*. *Pharm Biol* 40: 221-224.

Weniger B, Lagnika L, Vonthron-Sénécheau C, Adjobimey T, Gbenou J, Moudachirou M, Brun R, Anton R, Sanni A 2004. Evaluation of ethnobotanically selected Benin medicinal plants for their *in vitro* antiplasmodial activity. *J Ethnopharmacol* 90: 279–284.

Waako PJ, Katuura E, Smith P, Folb P 2007. East African medicinal plants as a source of lead compounds for the development of new antimalarial drugs. *Afr J Ecol* 45: 102–106.

Waako PJ, Gumede B, Smith P, Folb PI 2005. The *in vitro* and *in vivo* antimalarial activity of *Cardiospermum halicacabum* L. and *Momordica foetida* Schumch. Et Thonn. *J Ethnopharmacol* 99: 137–143.

Weniger B, Lagnika L, Vonthron-Sénécheau C, Adjobimey T, Gbenou J, Moudachirou M, Brun R, Anton R, Sanni A 2004. Evaluation of ethnobotanically selected Benin medicinal plants for their *in vitro* antiplasmodial activity. *J Ethnopharmacol* 90: 279–284.

World Health Organisation (WHO), 2008. World Malaria Report www.who.malariareport2008.org.

CAPÍTULO 3

Avaliação da atividade antimalárica da *Ximenia americana* L.

(Artigo a ser submetido à Journal of Ethnopharmacology)

Avaliação da atividade antimalárica da *Ximenia americana* L.

Valdiléia T. Uchôa^a, Antoniana U. Krettli^b e Antônio Euzébio G. Sant'Ana^{a*}

^aUniversidade Federal de Alagoas – Instituto de Química e Biotecnologia – 57.072-970 Maceió – Al – Brasil

^bInstituto Rene Rachou – Fundação Oswaldo Cruz - Laboratório de Malária – Avenida Augusto de Lima nº1715, 30190-002 Belo Horizonte – MG - Brasil

* Corresponding author. Tel.: 55.82.3241-1388; fax: 55.82.3214-1384
E-mail address: aegs@qui.ufal.br (Antônio Euzébio G. Sant'Ana^a).

Resumo

Os extratos etanólicos do caule, casca do caule e folhas de *Ximenia americana* (Olacaceae), foram avaliados para atividade antimalárica *in vitro* e *in vivo*, contra o *Plasmodium falciparum* (W2) e *Plasmodium berghei* (NK 65), respectivamente. Os extratos do caule e das folhas foram considerados ativos nos testes *in vitro*. Após a partição líquido-líquido destes extratos a atividade *in vitro* ficou restrita às frações clorofórmio e acetato de etila das folhas e às frações em hexano, clorofórmio e acetato de etila do extrato da casca do caule. Da fração acetato de etila das folhas foi obtido o flavonóide quercetina como o composto ativo e da fração em acetato de etila da casca do caule foi isolado o flavonóide epicatequina que mostrou-se inativo. Os extratos etanólicos da casca da madeira e de folhas foram submetidos aos testes *in vivo* e apresentaram-se ativos com redução da parasitemia de camundongos infectados com *P. berghei*.

Palavras-Chave: Antimalarial, Quercetina, Epicatequina, *Ximenia americana*

Abstract

The ethanol extracts of wood, wood bark and leaves of *Ximena americana* (Olacaceae), were evaluated for antimalarial activity with *in vitro* and *in vivo* against *Plasmodium falciparum* (W2) and *Plasmodium berghei* (NK 65), respectively. The extracts of wood and leaves were considered active *in vitro* tests. After liquid-liquid partition of the ethanolic extracts the *in vitro* activity was concentrated at the chloroform fraction and ethyl acetate fractions of leaves and at the hexane, chloroform and ethyl acetate fractions from the ethanolic extract from the wood bark. The ethyl acetate fraction of leaves was give rise the flavonoid quercetin, presenting themselves as active compounds and from the ethyl acetate fraction of the wood bark was obtained the flavonoid epicatechin that was inactive. The ethanol extracts of the wood bark and leaves were subjected to *in vivo* tests and showed moderate to high activity with the reduction of parasitemia in mice infected with *P. Berghei*.

Keywords: Antimalarial, Quercetin, Epicatequin, *Ximena americana*

1. Introdução

A malária possui alta morbidade em todo mundo e continua sendo endêmica nas regiões tropicais. Estima-se que o índice de mortalidade da malária está aproximadamente entre 1,5 a 2,7 milhões de pessoas por ano e mais de 75% destas mortes acometem crianças africanas (WHO, 2005).

Na Amazônia, a malária continua sendo um grave problema de Saúde Pública, devido à alta incidência e efeitos debilitantes da doença, apresentado um fator negativo sobre o desenvolvimento da região (Ministério da Saúde, 2007).

As principais razões para explicar o panorama atual da malária são a resistência do *Plasmodium falciparum* frente aos medicamentos atualmente em uso (Trape et al., 2002); falta de novos agentes terapêuticos (Bathurst e Hentschel, 2006) e a inviabilidade das drogas antimaláricas (Benoit-Vical et al., 1998). As alternativas para o tratamento são poucas e há uma necessidade urgente de pesquisas por novas drogas para o uso no tratamento da malária. Como a maioria dos povos afetados pela doença possui acesso limitado à medicação ocidental, efetiva mas de alto custo, as plantas medicinais constituem uma possibilidade viável e promissora.

Desde a descoberta da *Artemisia annua* na China na década de 70, quando esta planta foi introduzida mundialmente para o tratamento da malária, pesquisadores retomaram o interesse na investigação das propriedades medicinais das plantas como fonte alternativa para o tratamento antimalárico (Krettli et al., 2001; Muthaura et al., 2007).

Compostos com atividade antimalárica, extraídos de plantas da medicina popular, quando avaliados em modelos experimentais mostram que novas drogas para o tratamento da malária podem ser direta ou indiretamente derivadas dos produtos naturais (Kvist et al., 2006).

A *Ximenia americana* é encontrada na África, Índia, Nova Zelândia, América Central e do Sul. Ela é encontrada em abundância no nordeste brasileiro e é de ocorrência silvestre no Brasil (Matos, 2007; Braga, 1960; Pott e Pott, 1994). A planta é um arbusto com espinhos, pertencente à família Olacaceae conhecida popularmente no nordeste brasileiro como ameixa-da-baia, ameixa-da-terra, ameixa-de-espinho e sândalo-do-brasil (Matos, 2007; Braga, 1960).

Na Nigéria, a *X. americana* é utilizada na medicina popular no tratamento de estomatites, malária, sífilis, reumatismo, câncer e infecções bucais (Ogunleye e Ibitoye, 2003; Mwangi et al., 1994). Já no Brasil, esta planta é utilizada na medicina popular como antiséptico, febrífugo, contra icterícias, perturbação gástrica, cefaléia, como depurativo, reguladora menstrual, laxante, no tratamento das inflamações das mucosas e no tratamento do sarampo (Mevy et al., 2006; Uchôa et al., 2006; Omer e Elnima, 2003; Braga, 1960).

Estudos farmacológicos com a *X. americana* indicam que esta planta apresenta atividade anticâncer e antineoplásica (Voss, et al., 2006), anti-microbiana (Geyid et al., 2005; Omer e Elimina, 2003), antibacteriana (Koné et al., 2004), pesticida (Fatope et al., 2000) e antimalárica *in vitro* (Benoit et al., 1996).

No nosso programa de estudo de plantas com ação antimalárica, realizou-se o estudo fitoquímico biomonitorado com atividade antimalárica *in vitro* e *in vivo* do extrato etanólico das cascas do caule, caule e das folhas da espécie *Ximenia americana* L. de acordo com metodologias definidas para o estudo de plantas (Carvalho et al., 1991; Brandão et al., 1992).

2. Materiais e Métodos

2.1. Procedimento Geral Experimental

Os solventes foram adquiridos de Moraes de Castro (Recife-PE) e utilizados após destilação no Laboratório de Recursos Naturais - UFAL. Cromatografia em camada delgada (CCD) foi realizada em placas com gel de sílica 60 F₂₅₄ (20 x 20 cm, 0,2 mm) adquiridas da Merck (Darmstadt, Alemanha). A cromatografia em coluna (CC) foi realizada com gel de sílica 60 (70-230 Mesh) da Merck (Darmstadt, Alemanha) e Sephadex LH-20 da Pharmacia (Upsala, Suécia). As placas de TLC foram reveladas por irradiação com luz no UV (λ 254 nm) por exposição a vapores de I₂ e borrifação com solução de anisaldeído (50% ácido acético) ou solução ácida de sulfato cérico (10% ácido sulfúrico), seguido de aquecimento em estufa a 80 °C por 15 min.

2.2. Planta

O material vegetal da *Ximenia americana* L., foi coletado em abril 2002 no município de Campo Maior-PI e identificado pela botânica Dra. Maria Edilene Alencar. Uma exsiccata

encontra-se depositada no Herbário Grasiela Barroso da Universidade Federal do Piauí, sob o número de registro TEBP 14407.

2.3.Extração e Fracionamento

As folhas e caule da *X. americana* foram separadas e secas a temperatura ambiente ($26^{\circ}\text{C}\pm 1$). As partes da *X. americana*, casca do caule (3,3 kg), madeira do caule (2,5 kg) e folha (1,5 kg), foram trituradas em moinho tipo forrageira (Nogueira Itapira – SP, malha 2mm) e extraída com etanol 95% por 3 vezes consecutivas em um extrator de aço inoxidável a temperatura de $26^{\circ}\text{C}\pm 1$. Após concentração em aparelho rotatório à baixa pressão, foram obtidos os extratos etanólicos da madeira do caule (250g, 10%), da casca do caule (620g, 18%) e folhas (230g, 15%). Separadamente, os extratos etanólicos obtidos foram utilizados no teste de atividade antimalárica *in vivo* e *in vitro*.

Os extratos etanólicos da casca do caule (500 g), madeira do caule (200 g) e folhas (210 g) da *X. americana* foram suspensos em uma mistura MeOH/H₂O (2:3) e submetidos a um processo de partição líquido-líquido com hexano (3 x 700 mL), clorofórmio (3 x 700 mL) e acetato de etila (3 x 700 mL).

Após a remoção dos solventes das frações à baixa pressão em aparelho rotatório e liofilização da fração hidrometanólica, obtivemos quatro frações do extrato etanólico das folhas: em hexano (15,5g; 7,4%), em clorofórmio (7,5g; 3,2%), em acetato de etila (80,87g; 38,5%) e hidrometanólica (101g, 48%); quatro frações do extrato da casca do caule: em hexano (10,75g; 1,7%), em clorofórmio (7,2g; 1,2%), em acetato de etila (220g; 45%) e hidrometanólica (240g; 48%) e quatro frações do extrato da madeira do caule: em hexano (12,5g; 6%), em clorofórmio (10,3g; 4,9%), em acetato de etila (81g; 38,6%) e hidrometanólica (100g, 48%). Estas frações obtidas foram submetidas a ensaios biológicos.

2.4. Isolamento Fitoquímico

A fração em acetato de etila (200g) da casca do caule de cor vermelho foi submetida a cromatografia em coluna com gel de sílica desativada com água a 10% (800g) e eluída com acetato de etila e metanol. Foram obtidas três subfrações: **F3.1**-Acetato de etila (46,54g; 23,2%), **F3.2**-Acetato de etila (29,11g; 14,5 %) e **F3.3**-Metanol (76,66g; 38%). Cada fração foi obtida pela passagem de 1000 mL de solvente. A fração acetato de etila (F3.1) (40,0g) de cor marrom, foi submetida a cromatografia em coluna de gel de sílica (450g), em uma coluna de 72 cm de altura e com 7 cm de diâmetro. Foram coletadas 7 frações com o volume médio de 500 mL cada uma, empregando-se como eluentes clorofórmio, metanol e misturas destes.

A fração CHCl_3 :MeOH 20% (17g; 42,5%), após remoção de solvente, forneceu um sólido amorfo de cor vermelho. Uma alíquota (3,5g) desta fração foi submetida a um processo de cristalização em éter etílico e acetato de etila na proporção de 1:1. A mistura foi mantida em geladeira por 24 horas e submetida à filtração em funil de Buchner. O processo foi repetido por mais duas vezes e ao final obteve-se um precipitado de cor marron codificado como XACC-1 (1g, 28%), que foi submetido a testes biológicos.

A fração em acetato de etila das folhas (70g) foi submetida a cromatografia em carvão ativo (800 g) em um funil de Buchner. Foram obtidas seis frações pela passagem de 1000mL de cada um dos seguintes solvente: água (40g; 57%), etanol/água 1:1 (10g; 14%), etanol (7g; 10%), acetato de etila (5g; 7%), clorofórmio (2g; 3%) e hexano (2g; 3%).

A fração em acetato de etila (3g) de cor verde, foi submetida a cromatografia em coluna de gel de sílica (30g), em uma coluna de 65 cm de altura, com 4,0 cm de diâmetro e eluída como clorofórmio, metanol e mistura dos mesmos. Foram coletadas 35 frações de 30 mL cada. Após a análise por cromatografia em camada delgada de sílica (CCD), foram agrupadas as frações 17-24 (1,5g; 50%), eluídas em CHCl_3 /MeOH 20%, resultando em um material de cor laranja, que foi submetido a coluna de Sephadex LH-20, com 65 cm de altura e com 3,0 cm de diâmetro. Foram

coletadas 20 frações com o volume de 10 mL cada uma, usando o MeOH como único sistema de solvente. Este procedimento foi realizado 2 vezes e levou ao isolamento de um precipitado de cor amarelo codificado como **FOXA-7** (1g; 66,6%) que foi submetido a testes de atividade.

2.5. Teste de Atividade Antimalárica *in vitro*

Os extratos e compostos foram testados para atividade antimalárica *in vivo* e *in vitro*. Os testes *in vitro* foram realizados com cepas do *P. falciparum* W2, que é resistente à cloroquina, sensíveis à mefloquina, e BHZ 26/86, a partir de uma cepa isolada anteriormente de um caso de malária importada da região amazônica (Carvalho et al., 1988) e que é parcialmente resistente à cloroquina e sensíveis à mefloquina (Andrade-Neto et al., 2004). Todos os parasitas foram mantidos em cultura contínua a 37 °C utilizando o método dos eritrócitos humanos, descrito por Trager and Jensen, 1976. Os extratos e compostos foram submetidos ao ensaio tradicional (Carvalho et al., 1991) e aos ensaios com incorporação de [³H]-hipoxantina, como descrito por Desjardins et al., 1979 e modificada por Zalis et al., 1998. Para ambos os testes, uma solução-mãe de cada extrato e composto (10 mg/ml) foi diluída em meio completo (RPMI 1640 contendo 10% soros humanos, 2% de glutamina e 7,5% NaHCO₃).

A suspensão de glóbulos vermelhos, com aproximadamente 1% parasitemia foi distribuído em 96 poços de microplacas (100 µl/poço). As soluções dos extratos e compostos foram testadas em várias concentrações. Testes controles sem extratos ou com cloroquina, foram, executados em paralelo. Pelo método tradicional, o meio de cultura com ou sem extrato foi substituído após 24 e 48 h de incubação. Após 72 h de cultura, foram preparados esfregaços sanguíneos, codificados, corados com Giemsa e examinadas em 1000 × ampliação. O percentual de redução da parasitemia foi calculado em relação às culturas controle (média de seis), sem extrato. Todos os experimentos foram executados em duplicata e as drogas foram testadas em triplicata para cada dose. Para o método de incorporação de [³H]-hipoxantina, na fase trofosoíta

de parasitas no sangue sincronizado com sorbitol (Lambros and Vanderberg, 1979), foram cultivados em 96 poços em microplacas com 1-2% de parasitemia e 2% de hematócitos e, em seguida, incubadas como extratos testes. Os extratos e compostos testes foram diluídos em meio sem hipoxantina. Após incubação por 24 h, 25 µl/poço de meio contendo [³H]-hipoxantina (0,5 µCi/poço) foi adicionado, seguido de incubação de 18 h a 37 °C. A placa foi congelada e descongelada, e as células foram colhidas [Tomtec 96-Harvester (Tomtec Inc., Handen, CT, E.U.A.)] sobre filtros de fibra de vidro (Wallac Ou, Turku, Finlândia), os quais foram colocados em sacos (Wallac) e imersos em fluido de cintilações (Optiphase super mix, Wallac). Emissões radioativas foram contadas em um leitor Microbeta 1450 (Wallac). A inibição do crescimento do parasita foi avaliada a partir dos níveis de incorporação [³H]-hipoxantina, para gerar curvas de dose resposta. A meia resposta máxima inibitória (IC₅₀), em comparação com os controles sem extratos, foi estimada pela curva utilizando o software (Software Microcal Origin 5.0, Inc.), em triplicata, repetido duas ou três vezes.

2.6. Teste de Atividade Antimalárica *in vivo*

O teste *in vivo* supressivo (Peters, 1965) foi utilizado com algumas modificações (Carvalho et al., 1991). Resumidamente, camundongos adultos Suiços, com 20 ± 2 g de peso, foram inoculados pela via intraperitonal com 1×10⁵ células vermelhas sanguíneas infectadas com cepas de *P. berghei* NK65, um parasito cloroquina-sensível. Os animais infectados foram divididos randomicamente em grupos de 3–5 por gaiolas e tratados diariamente por via oral por 4 dias. As amostras dos extratos foram dissolvidas em solução aquosa de DMSO 0.2% (v/v) e diluída até o volume final desejado com solução salina, sendo que cada rato recebeu 200 µL. Dois grupos controle foram utilizados de cada vez, um tratado com cloroquina (≤15 mg/kg) e o outro não tratado ou tratado com solução salina, conforme especificado nos resultados.

Nos dias 5 e 7 após inoculação do parasito, esfregaços de sangue da cauda dos camundongos foram preparados, fixados com metanol, coradas com Giemsa, e microscopicamente examinadas pela contagem da parasitemia em 1000 até 6000 eritrócitos. A mortalidade foi monitorada diariamente até 30 dias após a infecção. A inibição do crescimento do parasita em grupos tratados com extrato, foi calculado em relação ao grupo controle não-tratados. Todos os extratos e compostos foram testados em paralelo em três experimentos independentes e realizados em triplicata.

2.7. Identificação das substâncias XACC-1 e FOXA-7

A substância XACC-1 apresenta-se como um sólido amorfo marrom, $P_f 239^\circ\text{C}$ (EtOH) e $[\alpha]_D^{29} -45$ ($c = 1,0$ MeOH). O espectro na região do IV, em solução sólida de KBr apresentou absorções intensas a 3502 e 3412 cm^{-1} características de grupo OH. No espectro RMN ^1H em CD_3OD , apresentou quatro dupletos em $\delta 7,00$ ($J = 1,5\text{ Hz}$), $5,94$ ($J = 2,3\text{ Hz}$), $5,97$ ($J = 2,3\text{ Hz}$) e $4,83$ ($J = 7,54\text{ Hz}$) que foram atribuídos aos hidrogênios H-2', H-8, H-6 e H-2. Os duplos dupletos em $\delta 2,88$ ($J = 4,5$ e $16,7\text{ Hz}$) e $\delta 2,76$ ($J = 2,7$ e $16,7\text{ Hz}$) foram atribuídos à prótons CH_2 do H-4. Os três sinais a $\delta 6,78$ e $6,82$ e $4,20$ referentes a cada um dos hidrogênios foram atribuídos aos H-5', H-6' e H-3. O espectro de massas apresentou um fragmento de massa m/z 288 de acordo com a fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_6$. A análise conjunta dos dados espectroscópicos uni e bidimensionais sugeriram a estrutura da epicatequina.

A substância FOXA-7, apresentou-se como um sólido de cor amarelo, com ponto de fusão 312°C . O espectro na região do IV apresentou bandas de absorções intensas a 3420 e 1725 cm^{-1} , indicando a presença de grupos hidroxila e carbonila, respectivamente. O espectro de ^1H RMN registra um duplo duplete em $\delta 7,64$ ($J = 8,5$ e $2,2\text{ Hz}$) referente a H-6', um duplete em $\delta 7,74$ ($J = 2,2\text{ Hz}$) para H-2' e três dupletos em $6,89$ ($J = 8,5\text{ Hz}$), $6,39$ ($J = 2,0\text{ Hz}$) e $6,20$ ($J = 2,0\text{ Hz}$) para os prótons H-5', H-8 e H-6 respectivamente. O espectro de massas forneceu pico de

massa m/z 303 confirmando a fórmula molecular $C_{15}H_{10}O_7$. A análise conjunta dos dados espectroscópicos uni e bidimensionais permitiram propor a estrutura da quercetina.

3. Resultados e Discussão

Desde a descoberta da quinina de *Cinchona* sp. e da artemisinina de *Artemisia annua*, tem-se investigado muito as plantas com o intuito de descobrir novos compostos com atividade antimalárica (Kinghorn e Balunas, 2005). Toda essa procura é devido a resistência do *Plasmodium falciparum* aos medicamentos atualmente disponíveis no mercado (Bathurst e Hentschel, 2006).

Estudos fitoquímicos das plantas usadas como antimaláricas na medicina popular, revelam que a presença de compostos fenólicos pode ser um indicativo da atividade antimalárica destas plantas (Reddy et al., 2003; Krettli et al., 2001).

Um espécimen da *X. americana* de origem africana, apresentou atividade contra o *Plasmodium falciparum* em teste antimalárico *in vitro* (Benoit, et al., 1996). Em nosso trabalho, a *X. americana* coletada no Nordeste Brasileiro foi dividida em três partes (casca do caule, madeira do caule e folhas) e os extratos obtidos em etanol foram testados para a atividade antimalárica *in vitro* e *in vivo*.

Os extratos etanólicos da madeira do caule e das folhas, foram considerados parcialmente ativos em teste *in vivo*, quando testadas nas concentrações de 500 mg/kg e 250 mg/kg por promoverem redução acima de 30% da parasitemia induzida pelo *P. berghei* (Tabela 01). Já o extrato da casca do caule mostrou-se inativo.

No teste *in vitro* realizado com cepas do *P. falciparum* os extratos da madeira do caule e das folhas apresentaram atividade limítrofe, na concentração de 50 µg/mL, enquanto o extrato da casca do caule mostrou-se inativo nas duas concentrações testadas (Tabela 01).

Após processo de partição líquido-líquido dos três extratos etanólicos em separado, as frações em hexano, em clorofórmio e em acetato de etila oriundas do extrato etanólico da casca do caule mostraram-se parcialmente ativas apenas na maior concentração (50 µg/mL) quando submetida ao testes *in vitro*.

Do extrato etanólico da madeira do caule apenas a fração obtida em clorofórmio mostrou-se promissora com redução da parasitemia de 57 a 86% nas concentrações de 25 µg/mL e 50 µg/mL, respectivamente, quando submetidas aos testes *in vitro* (Tabela 02).

As quatro frações obtidas da partição líquido-líquido do extrato etanólico das folhas apresentaram resultados significativos, com uma redução da parasitemia variando entre 48% a 97% na menor concentração testada *in vitro* (Tabela 02), embora não tenha sido observada a atividade *in vitro* do extrato bruto das folhas nas concentrações testadas de 25 µg/mL (Tabelas 1 e 2). Para as folhas destaca-se como a fração de maior atividade aquela obtida em acetato de etila, que normalmente é uma fração rica em compostos fenólicos.

O extrato etanólico da casca do caule que foi inativo em ambos os testes *in vivo* e *in vitro* nas concentrações testadas (Tabela 1), após o procedimento de partição líquido-líquido apresentou-se atividade nas frações em hexano, clorofórmio e acetato na concentração de 50 µg/mL, a maior concentração testada (Tabela 2). Já para o extrato etanólico da madeira caule, após a partição líquido-líquido, apenas a fração em clorofórmio apresentou atividade (Tabelas 1 e 2).

O estudo fitoquímico da fração em acetato de etila do extrato etanólico das folhas levou ao isolamento da quercetina (**2**) (Fig. 01), que quando submetida ao teste antimalárico *in vitro*, apresentou o valor do IC₅₀ de 1,75 µg/mL. A epicatequina (**1**) (Fig. 01), foi obtida da fração em acetato de etila da casca do caule e apresentou-se inativa, até mesmo na maior concentração testada (50 µg/ml) (Tabela 3). Comparando os derivados da quercetina, testados e discutidos na

literatura, observa-se que a quercetina apresenta melhor atividade antimalárica, descritos a Tabela 3 (Krettli et al., 2001).

Através do estudo fitoquímico por cromatografia de camada delgada (CCD), verificou-se que quercetina e epicatequina são compostos predominantes nos extratos das folhas e cascas. Deve-se ressaltar que a epicatequina foi detectada nas folhas da *X. americana*, e a quercetina na fração em acetato de etila do extrato da casca do caule sendo assim considerada a responsável pela atividade observada nesta fração.

Recentemente outros flavanóides isolados de *Erythrina fusca* foram testados contra o *Plasmodium falciparum* em teste antimalárico *in vitro*. Os resultados destes testes apresentaram os seguintes valores de IC₅₀: lupinifolina (12,50 µg/mL); citoflavonona (5,00 µg/mL); erytrisenegalona (>12,50 µg/mL); lonchocarpol A (1,60 µg/mL); liquiritigenina (>12,50 µg/mL); 8-prenilaidzeina (3,90 µg/mL) (Khaomek et al., 2008). Apenas o lonchocarpol A (1,60 µg/mL), apresentou valor de IC₅₀ inferior a quercetina (1,75 µg/ml).

4. Conclusão

Os resultados descritos neste trabalho validam o uso popular da *X. americana* no tratamento da malária. Os extratos das folhas e do caule apresentaram-se ativos em testes antimaláricos *in vivo* e *in vitro*. Após o fracionamento do extrato apenas a fração em acetato de etila das folhas apresentou redução significativa da parasitemia do *P. falciparum*, evidenciando a atividade antimalárica do flavonóide quercetina.

5. Referências

Andrade-Neto, V., Oliveira, F. Q., Krettli, A. U., Brandão, M. G. L., 2004. New evidences of antimalarial activity of *Bidens pilosa* roots extract correlated with polyacetylene and flavanoids. *Journal of Ethnopharmacology* 93, 39-42.

Bathurst, I., Hentschel, C. 2006. Medicines for Malaria Venture: sustaining antimalarial drug development. *Trends in Parasitology* 22, 301–307.

Benoit, F., Valentin, A., Pelissier, Y., Diafouka, F., Marion, C., Kone-Bamba, D., Kone, M., Mallie, M., Yapo, A., Bastide, J. M. 1996. *In vitro* antimalarias activity of vegetal extratscs used in West African tradicional medicine. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 54 (1), 67-71.

Benoit-Vical, F., Valentin, A., Cournac, V., Pelissier, Y., Mallie, M., Bastide, J.M. 1998. *In vitro* antiplasmodial activity of stem and root extracts of *Nauclea latifolia* S.M. (Rubiaceae). *Journal of Ethnopharmacology* 61, 173–178.

Bourdy, G., Jullian, V., Georges, S. Maurel, S., M. 2006. Validation of use of a traditional antimalarial remedy from French Guiana, *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. *Journal of Ethnopharmacology* 106, 348–352

Braga, E. M., Barros, R. M., Reis, T. A., Fontes, C. J. F., Moraes, C. G., Martins, M. S., Krettli, A. U. 2002. Association of the IgG Response to *Plasmodium falciparum* Merozoite Protein (c-terminal 19 kd) with Clinical Immunity to Malaria in the Brazilian Amazon Region. *American Society of Tropical Medicine and Hygiene* 66, 461–466.

Braga, R., 1960, Plantas do Nordeste Especialmente do Ceará; 4ª Edição, Editora Universitária – UFRN, Natal – Rio Grande do Norte.

Brandão, M. G. L., Grandi, T. S. M., Rocha, E. M. M., Sawyer, D. R., Krettli, A. U. 1992. Survey of medicinal plants used as antimalarials in the Amazon. *Jornal of Ethnopharmacology* 36(2), 175-182.

Carvalho, L. H., Rocha, E. M. M., Raslan, D. S. Oliveira, A. B. Krettli, A. U., 1988. *In vitro* activity of natural and synthetic naphthoquinones against erythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 21, 485-487.

Carvalho, L. H., Brandão, M. G. L., Santos-Filho, D., Lopes, J. L. C., Krettli, A. U. 1991. Antimalarial activity of crude extracts from Brazilian plants. Studied *in vivo* in *Plasmodium berghei*-infected mice and *in vitro* against *Plasmodium falciparum* in culture. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 24, 1113-1123.

Desjardins, R. E., Canfield, C. J., Haynes, J. D., Chulay, J. D., 1979. Quantitative assessment of antimalarial activity *in vitro* a semiautomated microdilution technique. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 16, 710.

Fatope, M. O., Adoum, O. A., Takeda, Y. 2000. C18 Acetylenic Fatty Acids of *Ximenia americana* with Potential Pesticidal Activity. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 48, 1872-1874.

Geyid, A., Abebe, D., Debella, A., Makonnen, Z., Abera, F., Teka, F., Kebede, T., Urga, K., Yersaw, K., Biza, T., Mariam, B. H., Guta, M. 2005. Screening of some medicinal plants of Ethiopia for their anti-microbial properties and chemical profiles. *Journal of Ethnopharmacology* 97, 421–427.

Khaomek, P., Ichino, C., Ishiyama, A., Sekiguchi, H., Namatame, M., Ruangrunsi, N., Saifah, E., Kiyohara, H., Otaguro, K., Omura, S., Yamada, H. 2008. *In vitro* antimalarial activity of prenylated flavonoids from *Erythrina fusca*. Journal of Natural Medicine 62, 217–220.

Kinghorn, A. D., Balunas, M. J. 2005. Drug discovery from medicinal plants. Life Sciences, 78, 431 – 441.

Koné, W.M., Atindehou, K. K., Terreaux, C., Hostettmann, K., Traoré, D., Dosso, M. 2004. Traditional medicine in North Côte-d’Ivoire: screening of 50 medicinal plants for antibacterial activity. Journal of Ethnopharmacology 93, 43–49.

Krettli, A.U., Andrade-Neto, V.F., Brandão, M.G.L., Ferrari, W.M.S. 2001. The search for new antimalarial drugs from plants used to treat fever and malaria or plants randomly selected: a review. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 96, 1033–1042.

Kvist, L. P., Christensen, S. B., Rasmussen, H. B., Meija, K., Gonzalez, A. 2006. Identification and evaluation of Peruvian plants used to treat malaria and leishmaniasis. Journal of Ethnopharmacology 106, 390-402.

Lambros, C., Vanderberg, J. P., 1979. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. Journal of Parasitology 65, 418-420.

Matos, F. J. A. 2007. Plantas medicinais: guia de seleção e emprego das plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil. Fortaleza: Imprensa Universitária, 122-124.

Mevy, J. P., Bessiere, J. M., Greff, S., Zombre, G., Viano, J. 2006. Composition of the volatile oil from the leaves of *Ximenia americana* L. Biochemical Systematics and Ecology 34, 549-553.

Ministério da Saúde, 2007. <http://portal.saude.gov.br/> (acesso em 02/01/2009)

Muthaura, C. N., Rukunga, G. M., Chhabra, S. C., Mungai, G. M., Njagi, E. N. M. 2007. Traditional antimalarial phytotherapy remedies used by the Kwale community of the Kenyan Coast. Journal of Ethnopharmacology 114, 377–386.

Mwangi, J. W., Malli, P., Gathu, L., Tanaka, T., Nonaka, G. 1994. Polyphenols of *Ximenia americana* var. Caffra. Fitoterapia, 65 (2), 185.

Ndiege, I. O., Kirira, P. G., Rukunga, G. M., Wanyonyi, A. W., Muregi, F. M., Gathirwa, J. W., Muthaura, C. N., Omar, S. A., Tolo, F., Mungai, G. M. 2006. Anti-plasmodial activity and toxicity of extracts of plants used in tradicional malaria therapy in Meru and Kilifi Districts of Kenya. Journal of Ethnopharmacology 106, 403-407.

Ogunleye, D. S., Ibitoye, S. F. 2003. Studies of antimicrobial activity and chemical constituents of *Ximenia americana*. Tropical Journal of Phamaceutical Research 2 (2), 239-241.

Omer, M. E. F. A., Elnima, E. I., 2003. Antimicrobial Activity of *Ximenia americana*; Fitoterapia 74, 122-126.

Peters, W., 1965. Drug resistance in *Plasmodium berghei* I. Chloroquine resistance. Experimental Parasitology 17, 80-89.

Pott, A., Pott, V. J. 1994. Plantas do Pantanal. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Centro de Pesquisa Agropecuária do Pantanal, Corumbá – Mato Grosso, 55.

Reddy, M. K., Reddy, V. B. M., Gunasekar, D., Murthy, M. M., Caux, C., Bodo, B. 2003. A flavone and an unusual 23-carbon terpenoid from *Andrographis paniculata*. *Phytochemistry* 62, 1271–1275.

Taylor, S., Berridge, V. 2006. Medicinal plants and malaria: an historical case study of research at the London School of Hygiene and Tropical Medicine in the twentieth century. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 100, 707-714.

Trager, W., Jensen, J. B., 1976. Human malaria parasites in continuous culture. *Science* 193, 673-675.

Trape, J. F., Pison, G., Spiegel, A., Enel, C., Rogier, C. 2002. Combating malaria in Africa. *Trends in Parasitology* 18, 224–230.

Uchôa, V. T., Júnior, R. A., Carvalho, C. M., Abreu, F. C., Goulart, H. F., Santana, A. E. G. 2006. Ação moluscicida da madeira do caule da *Ximenia americana* L. In 29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química.

Voss, C., Eyol, E., Frank, M., Von der Lieth, C. W., Berger, M. R. 2006. Identification and characterization of riproximin, a new type II ribosome-inactivating protein with antineoplastic activity from *Ximenia Americana*. *The FASEB Journal* 20, 334-345.

Zalis, M. G., Pang, L., Silveira, M. S., Milhous, W. K., Wirth, D. F., 1998. Characterization of *Plasmodium falciparum* isolated from the Amazon region of Brazil: evidence for quinine resistance. The American Society of Tropical Medicine and Hygiene 58 (5), 630-637.

Waako, P. J., Smith, P., Folb, P. I. 2005. In vitro interactions of *Aspilia africana* (Pers.) C.D. Adams, a traditional antimalarial medicinal plant, with artemisinin against *Plasmodium falciparum*. Journal of Ethnopharmacology 102, 262–268.

Waako, P. J., Gumede, B., Smith, P., Folb, P. I. 2005. The in vitro and in vivo antimalarial activity of *Cardiospermum halicacabum* L. and *Momordica foetida* Schumch. Et Thonn. Journal of Ethnopharmacology 99, 137–143.

WHO - World Health Organisation, 2005. World Malaria Report.
http://www.rbm.who.int/wmr2005/pdf/adv_e.pdf.

Tabela 01. Atividade antimalárica em teste *in vivo* e *in vitro* dos extratos etanólicos da *Ximenia americana*

	Atividade <i>in vivo</i> *		Atividade <i>in vitro</i> **	
Partes da Planta	Redução da parasitemia			
	500 mg/kg	250 mg/kg	50 µg/ml	25 µg/ml
Casca do caule	21%	0%	44%	0%
Madeira do caule	41%	70%	90%	48%
Folhas	48%	36%	77%	38%

* Extrato com redução de $\geq 30\%$ são considerados ativos. A cloroquina foi usada em paralelo na dose de 15-25 mg/kg (90-95%).

** Extrato com redução de $\geq 50\%$ são considerados ativos. A cloroquina foi usada em paralelo na concentração de 15-25 µg/kg (90-95%).

Tabela 02. Atividade antimalárica em testes *in vitro* das frações da casca do caule, madeira do caule e folhas da *Ximenia americana*

	Casca do caule		Madeira do caule		Folhas	
Frações	Redução da parasitemia					
	50µg/mL	25µg/mL	50µg/mL	25µg/mL	50µg/mL	25µg/mL
Hexânica	78%	32%	0%	0%	73%	58%
Clorofórmica	72%	45%	86%	57%	90%	77%
Acetanólica	98%	20%	28%	8%	99%	97%
Hidrometanólica	30%	0%	0%	0%	67%	48%

Extrato com redução de $\geq 50\%$ são considerados ativos. A cloroquina foi usada em paralelo na dose de 15-25 µg/kg (90-95%).

Figura 1. Substâncias isoladas 1((-)-epicatequina) e 2 (quercetina) da *X. americana*

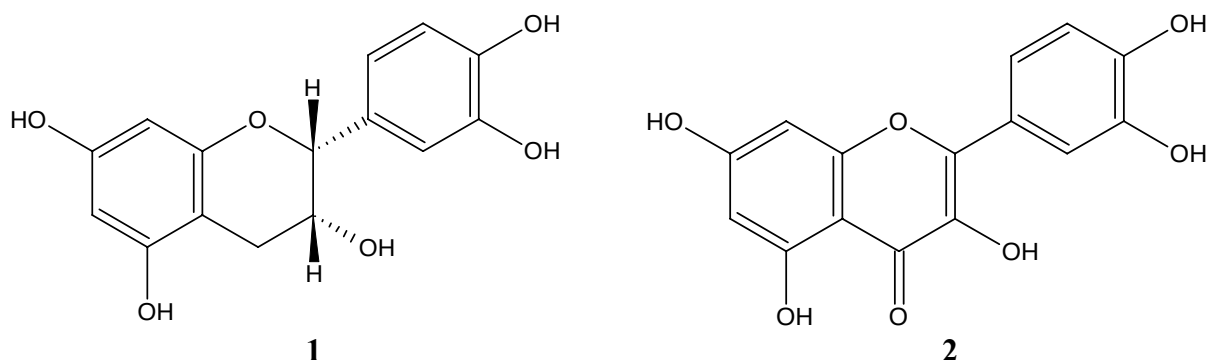


Tabela 03. Inibição do crescimento de *P. falciparum in vitro* (W2) e IC₅₀ dos compostos extraídos das frações acetanólicas da *Ximenia americana* testados em diferentes concentrações pelo método da Hipoxantina, em paralelo com a cloroquina.

Composto	% Inibição do Crescimento do Parasito						IC ₅₀
Concentração (µg/mL)	50	25	12.5	6.25	3.12	1.56	
Epicatequina	46.0	20.4	1.0	0	0	0	Inativa
Quercetina	74	82	70	44	22	12	1.75 µg/ml
Flavanóide (1)	90	85	73	34	NT	NT	
Flavanóide (2)	61	54	NT	NT	NT	NT	
Controles (µg/ mL)							
Artemisinina							0,0050 µg/ml
Artemeter							0,0014 µg/ml
Cloroquina							0,1700 µg/ml
Mefloquina							0,0260 µg/ml
Quinina							0,1300 µg/ml

NT: not testado;

Flavanóide (1): quercetina 3,3'-éterdimetil-7-0- α -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glicopirranose;

Flavanóide (2): quercetina 3,3'-éterdimeil-7-0- β -D-glicopirranose (Krettli et al., 2001).

CAPÍTULO 4

Antimalarial Activity of Compounds and Mixed Fractions of *Cecropia pachystachya* Tréc.

(Artigo submetido à Drugs Development Research)

Antimalarial Activity of Compounds and Mixed Fractions of *Cecropia pachystachya* Tréc.

Valdiléia Teixeira Uchôa,¹ Renata Cristina de Paula², Luisa G Krettli², Antônio Euzébio Goulart Santana,^{1*} Antoniana Ursine Krettli^{2**}

¹ Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, 57072-970, Maceió – AL, Brazil

² Laboratório de Malária, Centro de Pesquisas René Rachou, Av. Augusto de Lima 1715 Belo Horizonte – MG, 30190 -002 Brazil

* Corresponding author for the Chemistry part Tel.: +55.82 32 41.1388; fax: 55.82.3214-1384; and ** for the Pharmacological tests +55.31.3349-7770; fax 55.31 3295-3115

E-mail addresses:

aegs@qui.ufal.br (Antônio Euzébio G. Sant'Ana¹)

akrettli@cpqrr.fiocruz.br (Antoniana Ursine Krettli²)

Running title: Antimalarial *Cecropia pachystachya* Tréc

Keywords: *Cecropia pachystachya*, tormentic acid, antimalarial activity

**This work was supported by CNPq, FINEP, FAPEAL, RENORBIO and CAPES.

ABSTRACT (231 words)

Extracts from *Cecropia pachystachya* (Cecropiaceae), a medicinal plant used to treat fever, and two purified compounds from the active extracts were tested for their antimalarial activity against *Plasmodium falciparum* and/or *Plasmodium berghei* in mice. The ethanolic extracts of wood, root and leaves reduce parasitemia of malaria infected mice, especially the plant roots extracts which were further analyzed. Two compounds isolated and chemically characterized as β -sitosterol and tormentic acid, were active in mice malaria but only the tormentic acid acted in vitro against *P. falciparum* chloroquine resistant parasites (W2) in cultures reducing parasitemia in a dose response fashion (IC_{50} 11 to 15 μ g/mL). The antimalarial activity of the plant extracts kept refrigerated during eight years after the initial isolation, tested in parallel with new extracts freshly isolated from plants collected at the same geographical site confirmed the superiority of the plant roots and the stability of the active extracts. In this experiments, inhibition of parasite growth was measured by hypoxanthine incorporation and also by immunoenzymatic tests with monoclonal antibodies against the *P. falciparum* histidine rich protein (HRP2), expressed by the erythrocytic forms. The plant roots showed the lowest IC_{50} , and displayed the lowest toxicity, thus the best selective activity index. Thus *C. pachystachya* species represents a good candidate for phytotherapical use against human malaria. Further studies are in progress to isolate new active compounds through bioguided fractionated analysis, in the hope to develop a new drug prototype against *P. falciparum* erythrocytic parasites, our main goal.

1- INTRODUCTION

Historically, natural products have provided an endless source of medicines. Despite the diversification of drug discovery technology and reduced funding for natural product-based drug discovery, natural products from plants and other biological sources remain an undiminished source of new pharmaceuticals. It is often noted that 20% of all prescribed drugs are from plants [Farnsworth and Morris 1976; Raskin and Ripoll 2004; Schmidt et al, 2007]. This estimate suggests that plant-derived drugs make up a significant segment of natural product-based pharmaceuticals.

Studies have demonstrated the ability of plant secondary metabolites to potentiate the activity of anti-cancer drugs and/or other phytochemicals [Hemalswarya & Doble, 2006]. Some plant secondary metabolites have been shown to overcome multiple drug resistance in tumors [Hemalswarya & Doble, 2006] or in pathogenic bacteria when used in combination with other natural products or antibiotics. In particular, a number of plant extracts and natural products work synergistically with existing antibiotics, restoring antibiotic activity against resistant strains of bacteria such as *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* [Marquez et al., 2005; De Lima et al., 2006].

The terpenoids have made an important contribution to human healing and as antimalarials, among them, artemisinin from *Artemisia annua*, the best antimalarial at present [Abdin et al., 2003; Schmidt et al., 2007]. Current technologies for new chemical entities discovery from plants heavily favor constitutive compounds which are present at higher concentration. Bioguided assays performed in extracts and after applying chromatographic or partitioning methodologies, may improve the chances of detecting minor pharmacologically active components.

Cecropia pachystachya Tréc. (Cecropiaceae) tree is upright, from 5-15 feet tall, with trunks and segments where ants (*Azteca*) live in metabiosis. This plant is originated in tropical zones of the Americas [Oliveira et al. 2003]. In Brazil, the name of this plant usually known as "embaúba" or "imbaúba", originated from the word "ambaíba" that, in the Tupi language means "tree with hole" or tree that does not serve to buildings.

In traditional medicine, it is popularly used as a diuretic, tonic, antihemorrhagic, astringent, antiasthmatic, antitussive and antibleorrhagic extract. It can be used to treat whooping cough, respiratory infection, cardio-renal and cardio-pulmonary problems, along with tachycardia, bronchitis, high blood pressure, tuberculosis, and treatment of wounds and fever [Consolini et al., 2006; Braga, 1960]. Several other Brazilian plants used in the Amazon region where malaria is still endemic have been studied and shown important antimalarial activities, including *Cecropia* sp [Krettli 2009], a plant species largely spread all over Brazil. Most important, species of the gender *Cecropia* are popularly used to treat fever, a typical malarial symptom in humans acutely ill (at the time when the infected red blood cell ruptures to free the parasites which invade new erythrocytes).

In previous studies we detected antimalarial activity of *Cecropia glazioui* in preliminary data, using models in vitro and in vivo; the plant was chemically characterized by the group of Prof. Antonio J. Lapa (Escola Paulista de Medicina, UNIFESP, SP) (our unpublished results). At present, we describe the chemical and pharmacological characterization of the species *C. pachystachya*, shown in the literature to present several biological activities, i.e. cardiotonic and sedative [Consolini et al., 2006], cardiovascular [Consolini & Migliori, 2005], antioxidant [Velázquez et al. 2003] and angiotensive [Lacaille-Dubois et al., 2001].

2- EXPERIMENTAL

2-1. Experimental Procedures, plant material and fractionation

Solvents were purchased from Morais de Castro (Recife-PE) and used after distillation. Thin layer chromatographic plates (TLC) (aluminum-backed silica gel 60 F₂₅₄ pre-coated 20 x 20cm, layer thickness 0.2 mm) were purchased from Merck (E. Merck, Darmstadt Germany). Chromatographic columns (CC) were performed with silica gel 60 (70-230 mesh) from Merck (E. Merck, Darmstadt Germany) and Sephadex LH-20 from Pharmacia (Upsala, Sweden). TLC plates were revealed by irradiation with UV lamp (λ 254 nm), by immersion in I₂ vapor, followed by staining with anisaldehyde acid solution (50% acetic acid) or Liberman-Burchard solution or ceric sulphate acid solution (10% sulfuric acid) and then heated in oven at 80°C for 15 min.

2-1-1. Plant materials

Wood, leaves and roots of *Cecropia pachystachya* were collected in March 2002 in the city of São Miguel - Alagoas State by botanist Dr. Rosangela Lemos. The voucher is deposited at the Herbarium of IMA - Environmental Institute of Alagoas State, Brazil, under the number MAC 14,305. A new plant collection was performed in March 2009, at the original locality where the plant had been first collected.

2-1-2. Preparation of extracts

The plant was divided into five parts: root wood (3.7 kg), root bark (4.05 kg), wood (7 kg), wood bark (5 kg) and leaves (4.7 kg). They were dried at 40°C under forced ventilation in a oven and were ground into feed mill type (Nogueira Itapira - SP, mesh 2 mm) and extracted with 90% ethanol for 72 h, for three consecutive times, in a stainless steel extractor at 27.1°C.

After concentration in a rotary evaporator apparatus, at low pressure (1 mm Hg), the ethanolic extracts were obtained: root wood (170 g, 4.6%), root bark (125.22 g, 3.0%), wood

(200 g, 3.0%), wood bark (94.35 g, 1.9%) and leaves (248.86 g, 5.3%). The residual moisture was removed by freeze drying or by drying in a desiccator.

The ethanol extracts were fractioned (**Figure 1**) and the fractions subjected to tests of antimalarial *in vivo* using *P. berghei* in mice and cultures of the human malaria parasite *P. falciparum* (Table 1), as described [Andrade-Neto et al 2004a] and discussed thoroughly in a recent review [Krettli et al 2009].

2- 1- 3. Fractionation of the root extract

The ethanol extract of the root wood (160 g), after suspended in the mixture of methanol-water (2:3), was subjected to liquid-liquid partition using hexane (4 x 350 mL), chloroform (4 x 350 mL) and ethyl acetate (4 x 350 mL) providing five fractions: in hexane (MRP1) (9.22 g, 5.8%), chloroform (MRP2) (0.91 g, 0.6%), ethyl acetate (MRP3) (12.47 g, 7.8%), hydromethanolic (MRP-4) (36.61 g, 23.0%) and insoluble (97.15 g, 60.8%). Those fractions were also submitted to antimalarial *in vivo* tests (Table 02, Figure 1).

The fractionation using chromatographic column of MRP1 (8.50 g) in silica gel (Mesh 70-230) gave up seven sub fractions (Figure 1) which were tested for *in vivo* antimalarial activity, as listed in Table 03.

The active sub fraction MRP1.2 (2.65 g, 30.2%) was submitted to chromatography in column using silica gel impregnated with 10% potassium hydroxide ethanol solution. Hundred fractions with 10 mL, each, were collected using as eluents, hexane, chloroform, methanol and different mixtures. After TLC analysis (hexane-chloroform 15%, stained with anisaldehyde acid solution) the fractions 14-36, eluted with chloroform (1.50 g, 56.6%) led to the compound called CPMR-1 (1g, 38%), that was crystallized in ethanol, giving a odorless white solid (mp 135 °C - ETOH), identified as the steroid β -sitosterol (Figure 2).

The subfraction MRP1.7 (3.92 g, 42.5%) was submitted to a gel chromatography with Sephadex LH-20, using methanol as a single system solvent. Ninety fractions with 10 mL, each, were collected. The fractions 50-60 (400 mg, 10%) were combined after analysis by TLC (chloroform-methanol 1:1, stained with anisaldehyde acid solution) and after crystallization in ETOH, provided the compound CPMR-6 (odorless, amorphous white solid, mp 252°C - ETOH), identified as the triterpene tormentic acid, by comparison with spectral data available in the literature (Toniguci et al 2007).

2- 1-4. Identification of tormentic acid

Compound CPMR-6 is a white crystal, mp 252°C (ethanol), HRMS $C_{30}H_{48}O_5$ with m/z 511.3394 $[M + Na^+]$ observed and 511.3382 calculated. The IR spectrum showed the signals of the hydroxyl group at 3447 cm^{-1} and of the carbonyl at 1689 cm^{-1} . The ^1H NMR spectra have signals at δ 5.28 ($J = 3.8\text{ Hz}$), related to an olefinic hydrogen and signals at δ 3.95 (m) and δ 3.45 (d) ($J = 9.5\text{ Hz}$) assigned to carbinolic hydrogens.

The ^{13}C NMR spectra and DEPT showed 8 quaternary carbons, 7 methynic, 8 methylenic and 7 methyl groups and a signal for a carbonyl group at δ 181.36 ppm, followed by signals at δ 138.08 (quaternary carbon) and δ 128.35 (methynic carbon). The signals at δ 79.11 and δ 66.17 for methynic carbons are associated to the hydrogens at positions δ 3.95 and δ 3.45 respectively. The spectral analyses allowed to identify CPMR-6 as tormentic acid. Tormentic acid is a six membered-pentacyclic triterpenoid belonging to the ursane family (Figure 02), which has been isolated from plants of other families (Table), like Cecropiaceae, Combretaceae, Labiatae, Lamiaceae, Rosaceae, Tiliaceae. It was described as having the following activities: antileishmanial [Santos et al. 2004], anti-inflammatory [Wang et al., 2004; Jung et al., 2005; Murakami, et al. 2002], antitumor [Gao et al., 2003], fungicide [Hirai et al., 2000],

antinociceptive [Jung et al., 2005] and cytotoxic [Taniguchi et al., 2002]. It inhibits DNA polymerase [Chen et al., 2003]. Its antimalarial activity is herein described for the first time.

2- 2. Antimalarial tests against *P. falciparum*

The extracts and purified plant compounds were tested alone and in combination for antimalarial activity performed with *P. falciparum* a human malaria parasite which is maintained in continuous cultures as described by Trager & Jensen (1976). The inhibition of parasite growth was evaluated through different methodologies [Krettli et al. 2009], as follows.

2- 2- 1. The continuous cultures of *P. falciparum* and antimalarial tests

P. falciparum W2 clone, which is chloroquine-resistant and mefloquine-sensitive [Andrade-Neto et al., 2004a, 2004b], was kept in continuous culture at 37 °C using the candle jar method on human erythrocytes. The antimalarial effect of the compounds was measured through: (i) the traditional test counting parasitemia in coded blood smears at the microscope, as described [Carvalho et al., 1991] and, (ii) the [³H]- incorporation assay [Desjardins et al. 1979] slightly modified [Zalis et al. 1998]. For both tests, the parasites were maintained in complete culture medium (RPMI 1640 containing 10% human sera, 2% glutamine and 7.5% NaHCO₃) in culture dishes with daily changes of the culture medium. All experiments were run twice and the drugs tested in triplicate for each dose. For the [³H]- incorporation assay, the cultures were maintained during 4 or more days in medium without hypoxanthine and the trophozoite-stage parasites concentrated in sorbitol-synchronized blood [Lambros & Vanderberg, 1979]. A suspension of red blood cells with 2-3 % parasitemia was distributed in a 96-well microtiter plate (100 µL/well) for the traditional test and with 0.5% for the hypoxanthine test, with 2.5% hematocrit. The methods used to evaluate parasite growth were traditional microscopy, hypoxanthine incorporation, the immunoenzymatic ELISA test anti-HRP2.

2- 2- 1-1. The traditional microscopy test

The extracts and fractions were tested at various concentrations, as shown in the results, using the drug stock solution of each compound (10 mg/mL) previously diluted in DMSO 0.2% (v/v) at various concentrations. Controls without drugs or with chloroquine, a reference antimalarial drug, were run in parallel in each test. For the traditional method, the culture medium with or without drugs was replaced after 24 and 48 h of incubation. After 72 h in culture, blood smears were prepared, coded, stained with Giemsa, and examined at 1000× magnification. The percent reduction of parasitemia was calculated in relation to control cultures (average of six) in complete medium without drugs.

2- 2- 1-2. The hypoxanthine test

For the hypoxanthine test, the drugs were diluted in an aqueous solution of DMSO 0.2% (v/v), then in medium without hypoxanthine, following incubation with the parasites for 24 h, after which 20 µL/well of medium containing [³H] (0.5 µCi/well) were added to each well, following incubation 18 h, 37 °C [Andrade-Neto et al 2004a]. The plates were frozen and thawed and the cells harvested [Tomtec 96-Harvester (Tomtec Inc., Handen, CT, USA)] on glass-fiber filters (Wallac Ou, Turku, Finland), which were placed in sample bags (Wallac) and immersed in scintillation fluid (Optiphase super mix, Wallac). Radioactive emission was counted in a 1450 Microbeta reader (Wallac). The inhibition of parasite growth was evaluated from the [³H]-incorporation levels, plotted to generate dose/response curves. The half-maximal inhibitory response (IC₅₀) as compared to the drug-free controls was estimated by using curve-fitting software (Microcal Origin Software 5.0, Inc.) in triplicate, repeated two or three times.

2- 2-1-3. The ELISA-HRP2

The HRP2 test was performed as previously described [Noedl et al. 2002]. Briefly, cultures of *Plasmodium falciparum* (1.5% hematocrit; 0.05% parasitemia) were placed in 96 wells plates with the test and control compounds at different concentrations, and incubated for 72 h in the same culture conditions described above. After 24 h of incubation, the content of six wells (controls in medium and no drugs) were harvested and frozen in microtubes so that the average value obtained from these wells was subtracted from the other wells to exclude the background value (production of HRP2 in the first 24 h incubation). After a total of 72 h incubation the plates were frozen and thawed twice for total erythrocyte lyses and 100 µL/well of the material placed in another plate for the ELISA test. This plate had been pre-coated with the primary antibody anti-HRP2 (MPFM-55A ICLLAB[®], USA) overnight at 4°C, the content discarded, replaced by the blocking solution (PBS/BSA 2% 200 µL/well), incubated two hours, and the content was discarded. The hemolyzed cultures were transferred to the ELISA pre-coated plate, incubated (1 h, room temperature), discarded, incubated 1h with the secondary antibody (MPFG55P -ICLLAB[®], USA; 100 µL/well), then incubated with 100 µL/well of TMB chromogen (15 min at room temperature) in the dark. The reaction was stopped with 50 µL of 1 M sulphuric acid and the absorbance read at 450 nm in a spectrophotometer (SpectraMax340PC³⁸⁴, Molecular Devices).

2- 3. Antimalarial tests in vivo against *P. berghei*

The suppressive test in mice infected with malaria [Peters, 1965] was used with some modifications [Carvalho et al., 1991]. The decision to test the samples in mice not in vitro at first, was the high insolubility of most of them, which require the use of DMSO at a concentration unsuitable for in vitro tests, in addition of using goma Arabic???. Briefly, adult outbred Swiss mice, 20±2 g weight, were inoculated by the intraperitoneal route with 1×10^5 red blood cells

infected with *P. berghei* NK65 strain, a chloroquine-sensitive parasite. The infected animals were divided randomly into groups of 3–5 per cage, and daily treated by oral route, during 4 consecutive days with the dose specified in the results. The drug samples dissolved in DMSO 0.2% (v/v) were diluted to the desired final volume with saline, so that each mouse received 200 μ L. Two control groups were used, one treated with chloroquine (≤ 15 mg/kg) and one not treated or treated with saline, as specified in the results. On days 5 and 7 after parasite inoculation, blood smears were prepared from the mouse tail, methanol-fixed, stained with Giemsa, and microscopically examined by counting parasitemia in 1000 up to 6000 erythrocytes. Overall mortality was monitored daily until day 30 after infection. Inhibition of parasite growth in the drug-treated groups was calculated in relation to the non-treated control group. All compounds and combinations were tested in parallel in three independent experiments. All assays were performed in triplicate.

2- 4. Cytotoxicity tests with a human hepatoma cell line

The hepatoma cells Hep G2A16 were maintained at 37°C, 5% CO₂ in 25 cm² sterile culture flasks (Nunc[®]) with William's E culture medium (Sigma[®]) supplemented with 10% FBS, penicillin (10 U/mL) and streptomycin (100 I g/mL), with changes of medium twice a week. The cells were maintained by weekly passages (at 1:3 dilutions in sterile culture flasks) and grown to confluence. They were used for experiments after being trypsinized (0.05% trypsin/0.5 mM EDTA) and plated on Lab-Tek slides [Calvo-Calle et al., 1994]. When confluent, the monolayers were trypsinized, washed, counted, diluted in complete medium, distributed in 96-well microtiter plates (40×10^3 cells/well), then incubated for another 18 h at 37°C. The test compounds and control drugs were diluted in 0.02% final concentration of Tween-20 in culture medium to obtain six drug concentrations obtained in serial twice dilutions starting at 1000 μ g/mL. After a period of 24 h incubation at 37°C, 20 μ L of MTT solution (5 mg/mL in RPMI 1640 without phenol red)

without phenol red were added to each well, following another 3 h incubation at 37°C; the supernatant was removed, 20 µL of acidified isopropanol was added to each well. The culture plates were read by spectrophotometer with a 570 nm filter and a background of 630 nm. The minimum lethal dose was determined as described [Madureira et al., 2002], slightly modified in tests performed in duplicate, where the doses killing 50% of the cells (MLD 50%) was considered toxic. The selective index of antimalarial activity was calculated based on the in vitro activity (IC50) against *P. falciparum* and the MLD 50%, as described [Sá et al 2009].

3. Results and discussion

Terpenoids, also known as isoprenoids, are perhaps the most diverse family of natural products synthesized by plants, serving a range of important physiological and social functions. Over 40.000 different terpenoids have been isolated from plants, animal and microbial species [Rohdich et al., 2005; Withers & Keasling, 2007]. Plant terpenoids are classified as primary metabolites, necessary for cellular function and maintenance, or secondary metabolites that are not involved in growth and development. Secondary metabolic terpenoids are often commercially attractive because of their uses as flavor and color enhancers, agricultural chemicals and medicines [Roberts, 2007]. Very few of them have been investigated from a functional perspective. In part, this is a legacy of the once widely held belief that all natural products are metabolic wastes. However, starting in the 1970s, some terpenes were demonstrated to be toxins, repellents or attractants to other organisms, which raised the hypothesis of their ecological roles in antagonistic or mutualistic interactions among organisms [Langenheim, 1994].

Aiming to find new antimalarial drugs based on ethnopharmacology, we selected the species *C. pachystachya* to perform chemical studies and to evaluate its activity against blood malaria parasites, first in mice infected with *P. berghei*. Among five extracts and fractions of *C. pachystachya* tested, two were active - the wood and wood roots, causing parasitemia inhibition

of 35% to 54% and 48% to 66%, respectively, on days 5 and 7 after parasite inoculation, in relation to untreated control mice (Table 1).

The fractions from the root ethanol extract obtained after partition using liquid-liquid chromatography were next evaluated as antimalarials (Table 2). The hexane fraction reduced parasitemia by 42% (at the dose of 500 mg/kg) being then submitted to a chromatographic process that resulted in seven subfractions (Figure 1), tested also *in vivo* (Table 3). The subfractions MRP1.2 (Hex./CHCl₃ 10%), MRP1.5 (CHCl₃/MeOH 5%) and MRP1.7 (CHCl₃/MeOH 1:1) were active suppressing parasitemia by 48%, 62% and 55%, respectively.

After the chromatographic process, subfractions MRP1.2 and MRP1.7 led to the isolation, respectively, of tormentic acid and β -sitosterol (Figure 2A, 2B) that were tested for antimalarial activity *in vivo* against *P. berghei*. Both showed significant activity at a dose of 15 mg/kg, reducing parasitemia up to 58% at day 8 after parasite inoculation (Table 5). Chloroquine tested in parallel inhibited 100% and 76% respectively at doses of 15 and 10 mg/kg.

Tormentic acid tested in serial dilutions by the method of hypoxanthine incorporation in two independent experiments, in parallel with chloroquine, allowed determination of the IC₅₀ (Table 6). The activity and values were further confirmed in the traditional test, when tormentic acid and β -sitosterol were tested in parallel; β -sitosterol had only a borderline activity (Table 7). Next, tormentic acid was tested alone (**Figure 3A**) and in association with β -sitosterol, at the molar ratio 1:1; the activity of the mixture was reduced (IC₅₀ of 23.13 μ g/ml) in half, as compared to the activity of tormentic acid alone (**Figure 3B**). This was surprising since both compounds had a similar activity *in vivo*, a result that needs further studies to be clarified.

In another series of experiments, the plant extracts kept frozen for several years were tested in parallel with plant extracts freshly prepared, against *P. falciparum* blood cultured parasites, using the hypoxanthine test and an immunoenzymatic ELISA-HRP2, as described by Noedl et al (2002). The production of histidine-rich protein II (HRP2) by *P. falciparum* parasites

is believed to be closely associated with the parasite proliferation, thus allows evaluating inhibition of parasite growth as a measure of drug susceptibility. The chemotherapy test quantifying this protein is presumably easier to establish and to perform, and is considered as reliable as the assay of hypoxanthine incorporation [Noedl et al 2002]. Indeed, we found the ELISA- HRP2 more practical than either method. The test, run in parallel with the hypoxanthine, confirmed the stronger activity of the plant root wood. The IC₅₀ values were slightly lower than those found in the hypoxanthine test. Based on the ratio between activity and toxicity the roots woods extracts, had the best antimalarial selective activity (>529.1) (Table 8).

Other studies of Brazilian medicinal plants allowed us selecting candidates for antimalarial drug development with several collaborators in Brazil, for example: (i) lignans isolated from *Holostilis reniformis* [Andrade-Neto et al 2007]; (ii) several phenazines [Andrade-Neto et al 2004a] derived from β -lapachone and lapachol, a prenylnaphthoquinone isolated from plants of the Bignoniaceae family (structurally related to atovaquone (an antimalarial drug active against *P. falciparum*); (iii) polyacetylene and flavonoids from *Bidens pilosa* roots extract [Andrade-Neto et al 2004b]; (iv) betulinic acid from *Zizyphus joazeiro* Mart. (Rhamnaceae), and some of its derivatives, active against *P. falciparum* chloroquine resistant parasites and in malaria infected mice [Sá et al 2009].

In short, *C. pachystachya* a plant used against several pathologies is a potential phytotherapeutic against malaria since extracts from different parts of the plant were active *in vivo* against malaria parasites, thus in support of its medicinal. Two compounds were isolated from the active extracts, but only tormentic acid extracted from the plant roots extracts was active *in vivo* against a rodent malaria and in cultures of the blood malaria human parasite *P. falciparum*. It represents thus a potential new prototype compound confirming ethnopharmacology as an important approach in the search for new antimalarial drugs.

4. Conclusions

Several extracts from the medicinal plant *Cecropia pachystachya* have shown consistent activity against malaria, *in vivo* in infected mice and against the human parasite *P. falciparum*. Tormentic acid isolated from the hexane extract of the roots was also active against W2 strains of *P. falciparum* and *in vivo*, whereas β -sitosterol tested in parallel showed no significant activity. This was surprising because tormentic acid and β -sitosterol were active in mice at concentrations of 15 mg/Kg. However, the mixture has not yet been tested *in vivo* and this experiment needs to be performed. The use of different methodologies with *P. falciparum* cultures confirmed the stronger activity of the *Cecropia* roots; the extracts inhibited the parasite growth. In preliminary studies we further confirmed the activity of frozen and fresh plant extracts, tested in parallel in the hypoxanthine and the ELISA-HRP2 tests, the later being performed with species specific monoclonal antibodies. The plant roots extracts displayed also low toxicity, thus a good selectivity index, making it a candidate for antimalarial phytotherapy in support of disease control, and an excellent material for further isolation of products aiming prototypes for new antimalarials, our present goal.

5- Acknowledgments

The authors are thankful to CNPq (Projects 480771/2008-1; 575746/2008), to FIOCRUZ (PAPES 403570/2008-5) for the financial support; to Lucas M. Felipe and Mikael de Lima Freitas (CNPq fellows) for technical help; to Drs. Anderson A. Andrade and Rodrigo Soares, CNPQ Pos-Doctors who helped settling the hypoxanthine test and testing the first extracts; to Gabriele Rocha, Isabela Freitas Oliveira and several other students at the Malaria laboratory for helping with the tests *in vivo*; and, especially, to Dr. Marilia O.F Goulart for many helpful comments and suggestions on the final version of the manuscript.

6. References

Abdin MZ, Israr M, Rehman RU, Jain SK. 2003. Artemisinin, a novel antimalarial drug: Biochemical and molecular approaches for enhanced production. *Planta Medica* 69:289-299.

Andrade-Neto VF, Goulart MO, da Silva Filho JF, da Silva MJ, Pinto MC, Pinto AV, Zalis MG, Carvalho LH, Krettli AU. 2004a. Antimalarial activity of phenazines from lapachol, beta-lapachone and its derivatives against *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium berghei* in vivo. *Bioorg Med Chem Lett* 14(5):1145-1149.

Andrade-Neto V, Oliveira FQ, Krettli AU, Brandão MGL. 2004b. New evidences of antimalarial activity of *Bidens pilosa* roots extract correlated with polyacetylene and flavanoids. *J Ethnopharmacol* 93:39-42.

Andrade-Neto VF, da Silva T, Lopes LM, do Rosário VE, Pilla Varotti F, Krettli AU. 2007. Antiplasmodial activity of aryltetralone lignans from *Holostylis reniformis*. *Antimicrob Agents Chemother* 51(7):2346-2350.

Andrade-Neto VF, Goulart MO, da Silva Filho JF, da Silva MJ, Pinto MC, Pinto AV, Zalis MG, Carvalho LH, Krettli AU. 2004. Antimalarial activity of phenazines from lapachol, beta-lapachone and its derivatives against *Plasmodium falciparum* in vitro and *Plasmodium berghei* in vivo. *Bioorg Med Chem Lett* 14(5):1145-1149.

Calvo-Calle JM, Moreno A, Eling WM, Nardin EH. 1994. development of infectious liver stages of *P. yoelii* and *P. berghei* malaria in human cell lines. *Exp Parasitol* 79:362–373.

Carvalho LH, Brandão MGL, Santos-Filho D, Lopes JLC, Krettli AU. 1991. Antimalarial activity of crude extracts from Brazilian plants studied in vivo in *Plasmodium berghei*-infected mice and against *Plasmodium falciparum* in culture. *Braz J Med Biol Res* 24:1113-1123.

Chen JH. 2003. High-performance liquid chromatographic analysis of bioactive triterpenes in *Perilla frutescens*. *J. Pharm Biomed Anal* 32:200-206.

Consolini AE, Migliori GN. 2005. Cardiovascular effects of the South American medicinal plant *Cecropia pachystachya* (Ambay) on rats. *J. Ethnopharmacol* 96:417–422.

Consolini AE, Ragone MA, Migliori GN, Conforti P, Volonté MG. 2006. Cardiotonic and sedative effects of *Cecropia pachystachya* Mart. (Ambay) on isolated rat hearts and conscious mice. *J Ethnopharmacol* 106:90–96.

De Lima MRF, Luna JS, dos Santos AF, de Andrade MCC, Sant’Ana AEG, Genet JP, Moreau N. 2006. Antibacterial activity of some Brazilian medicinal plants. *J Ethnopharmacol* 105:137-147.

Desjardins RE, Canfield CJ, Haynes JD, Chulay JD. 1979. Quantitative assessment of antimalarial activity a semiautomated microdilution technique. *Antimicrobial Agents Chemother* 16: 710-718.

Farnsworth, NR, Morris RW.1976. Higher plants - the sleeping giant of drug development Am J Pharm Science Support. Publ Health. 148. 46-52.

Garcez FR, Garcez WS, Martins M, Lopes FA. 2003. Triterpenoids, lignan and flavans from *Terminalia argentea* (Combretaceae). Biochem Syst Ecol 31:229-232.

Gao H, Wu L, Kuroyanagi M, Harada K, Kawahara N, Nakane T, Umehara K, Hirasawa K, Nakamura Y. 2003. Antitumor-promoting constituents from *Chaenomeles sinensis* Koehne and their activities in JB6 mouse epidermal cells. Biol Pharmaceutical Bull 51:1318-1321.

Hirai N, Sugie M, Wada M, Lahlou EH, Kamo T, Yoshida R, Tsuda M, Ohigashi H. Triterpene phytoalexins from strawberry fruit, Bioscience, Biotechnol Biochem 64:1707-1712.

Hemalswarya S, Doble M. 2006. Potential synergism of natural products in the treatment of cancer Phytotherapy Res 20:239-249.

Jung H, Nam J, Choi J, Lee K, Park H. 2005 19 α -Hydroxyursane-type triterpenoids: antinociceptive, anti-inflammatory principles of the roots of *Rosa rugosa*, Biol Pharmaceutical Bull 28:101-104.

Krettli, AU. 2009. Antimalarial drug discovery: screening of Brazilian medicinal plants and purified compounds. Expert Opin Drug Discov 4(2):1-14

Krettli AU, Adebayo JO, Krettli LG. 2009. Testing of natural products and synthetic molecules aiming at new antimalarials. *Current Drug Targets* 10:261-270.

Lacaille-Dubois MA, Franck U, Wagner H. 2001. Search for potential angiotensin converting enzyme (ACE)-inhibitors from plants. *Phytomedicine* 8:47–52.

Lambros C, Vanderberg JP. 1979. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *J Parasitol* 65:418-420.

Langenheim, J. H. 1994. Higher plant terpenoids: a phytocentric overview of their ecological roles. *J Chem Ecology* 20:1223-1280.

Madureira MC, Martins AP, 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. *J Ethnopharmacol* 8:23–29.

Marquez B, Neuville L, Moreau NJ, Genet JP, dos Santos AF, de Andrade MCC, Sant’Ana AEG. 2005. Multidrug resistance reversal agent from *Jatropha elliptica*. *Phytochemistry* 66:1804-1811.

Murakami C, Ishijima K, Hirota M, Sakaguchi K, Yoshida H, Mizushima Y. 2002. Novel anti-inflammatory compounds from *Rubus sieboldii*, triterpenoids are inhibitors of mammalian DNA polymerases. *Biochim Biophys Acta* 1596:193-200.

Noedl H, Wernsdorfer WH, Miller RS, Wongsrichanalai C. 2000. Histidine-Rich protein II: a novel approach to malaria drug sensitivity testing. *Antimicrobial Agents Chemother.* 46(6):1658–1664.

Oliveira RR, Moraes MCC, Castilho RO, Valente AP, Carauta TPP, Lopes D, Kaplan MAC. 2003. High-speed counter-current chromatography as a valuable tool to isolate C-glycosyflavones from *Cecropia lyratiloba* Miquel. *Phytochem Anal* 14:96-99.

Palme EA, Rita R, Morelli I. 1996. Flavonols and isoflavones from *Cotoneaster simonsii*. *Phytochemistry* 42:903-905.

Peters W. 1965. Drug resistance in *Plasmodium berghei* I. Chloroquine resistance. *Exper Parasitol* 17:80-89.

Raskin I, Ripoll C. 2004. Can an Apple a Day Keep the Doctor Away? *Curr. Pharmaceutical Design* 10(27):3419-3429.

Roberts SC. 2007. Production and engineering of terpenoids in plant cell production. *Nature Chem Biol* 3:387-395.

Rohdich F, Bacher A, Eisenreich W. 2005. Isoprenoid biosynthetic pathways as anti-infective drug targets. *Biochem Soc Trans* 33:785-791.

Sá MS, Costa JFO, Krettli AU, Zalis MG, Azevedo MGL, Fachine-Sette IV, Câmara AC, Barbosa, JM F, Giulietti-Harley AM, dos Santos RR, Soares MPB. 2009. Antimalarial activity of

betulinic acid and derivatives against *Plasmodium falciparum* and in vivo in *P. berghei*-infected mice. *Parasitol Res* 105:275–279 DOI 10.1007/s00436-009-1394-0.

Santos ECT, Lopes D, Oliveira RR, Carauta JPP, Falcão BCA, Kaplan MAC, Rossi-Bergmann B. 2004. Antileishmanial activity of isolated triterpenoids from *Pourouma guianensis*. *Phytomedicine* 11:114-120.

Schmidt BM, Ribnicky DM, Lipsky PE, Raskin I. 2007. Revisiting the ancient concept of botanical therapeutics. *Nature Chem Biol* 3(7):360-366.

Taniguchi S, Imayoshi Y, Kobayashi E, Takamatsu Y, Ito H, Hatano T, Sakagami H, Tokuda H, Nishino H, Sugita D, Shimura S, Yoshida T. 2002. Production of bioactive triterpenes by *Eriobotrya japonica* calli. *Phytochemistry* 59:315-323.

Trager W, Jensen JB. 1976. Human malaria parasites in continuous culture. *Science* 193:673-675.

Varotti FD, Botelho ACC, Andrade AA, De Paula RC, Fagundes EMS, Valverde A, Mayer LMU, Mendonça JS, De Souza MVN, Boechat N, Krettli AU. 2008. Synthesis, Antimalarial Activity, and Intracellular Targets of MEFAS, a New Hybrid Compound Derived from Mefloquine and Artesunate. *Antimicrob Agents Chemother* 52(11):3868-3874.

Velázquez E, Tournier HA, de Buschiazzi PM, Saavedra G, Schinella GR. 2003. Antioxidant activity of Paraguayan plant extracts. *Fitoterapia* 74:91-97.

Zalis MG, Pang L, Silveira MS, Milhous WK, Wirth DF. 1998. Characterization of *Plasmodium falciparum* isolated from the Amazon region of Brazil: evidence for quinine resistance. *American Soc Tropical Med Hyg* 58(5):630-637.

Wang JW, Xia ZH, Chu JH, Tan RX. 2004. Simultaneous production of anthocyanin and triterpenoids in suspension cultures of *Perilla frutescens*, *Enzyme and Microbial Technology* 34: 651-656.

Withers ST, Keasling JD. 2007. Biosynthesis and engineering of isoprenoid small molecules. *Applications Microbiological Biotechnology* 73:980-990.

TABLE 1 - *In vivo* antimalarial activity of ethanolic extracts of *Cecropia pachystachya* tested in Swiss albino mice infected with *Plasmodium berghei*

Plant part	Dose (mg/kg)	Parasitemia	Results
Wood bark	250	11%	Inactive
	500	0%	
Leaves	250	24%	Borderline*
	500	37%	
Wood	250	35%	Active
	500	54%	
Root wood	250	66%	Active
	500	48%	

Extracts that led to reduction $\leq 20\%$ of parasitemia were considered inactive.

Chloroquine at the dose of 15-25 mg/kg (90-95%) was used as a positive control.

TABLE 2 - Antimalarial activity of ethanolic extract fractions from *Cecropia pachystachya* roots tested at dose 500mg/kg

Fraction	Origin of the extract	Reduction of parasitemia	Results
MRP1	Hexane	42%	Active
MRP2	Chloroform	17%	Inactive
MRP3	Ethyl acetate	11%	Inactive
MRP4	Hydroalcoholic	0%	Inactive

Fractions reducing in $\leq 20\%$ parasitemia were considered inactive. Chloroquine at doses of 15-25 mg/kg reduced parasitemia around 90-95% in different tests.

TABLE 3 - *In vivo* antimalarial activity of MRP1 sub-fractions from ethanol extracts from *Cecropia pachystachya* roots tested at dose 500 mg/kg

Name	Subfractions	Reduction of parasitemia		Conclusion*
		Day 5	Day 7	
MRP1.1	Hex/CHCl ₃ 2.5%	9%	1%	Inactive
MRP1.2	Hex/CHCl ₃ 10%	48%	49%	Active
MRP1.3	Hex/CHCl ₃ 1:1	0%	12%	Inactive
MRP1.4	CHCl ₃	0%	0%	Inactive
MRP1.5	CHCl ₃ /MeOH 5%	62%	55%	Active
MRP1.6	CHCl ₃ /MeOH 10%	0%	0%	Inactive
MRP1.7	CHCl ₃ /MeOH 1:1	55%	32%	Active

*Fractions reducing $\leq 20\%$ of parasitemia are considered inactive; fractions reducing 21 to 30% parasitemia were partially active; $\geq 31\%$ were considered active.

Table 4 – Species of plants where the triterpene tormentic acid has been demonstrated, some of which with reported biological activities.

Family/Species	Part of the plant studied	Biological activity	Reference
Cecropiaceae			
<i>Myrianthus serratus</i>	Steam wood	Not determined	Lontsi et al., 1998
Combretaceae			
<i>Terminalia argentea</i>	Leaves/Trunk bark	Not determined	Garcez et al., 2003
Labiatae			
<i>Perilla frutescens</i>	Leaves	Anti-inflammatory	Wang et al., 2004
Moraceae			
<i>Pourouma guianensis</i>	Leaves	Anti- <i>Leishmania</i>	Santos et al., 2004
Rosaceae			
<i>Cotoneaster simonsii</i>	Steam wood	Not determined	Palme et al., 1996
<i>Eriobotrya japonica</i>	Leaves	Cytotoxic	Taniguchi et al., 2002
<i>Margyricarpus setosus</i>	Steam wood	Anti-HIV	Tommasi et al., 1998
<i>Rubus sieboldii</i>	Fresh leaves	Anti-inflammatory	Murakami et al., 2002

TABLE 5 – Antimalarial activity of tormentic acid and β -sitosterol tested against *Plasmodium berghei* in mice, measured by percent inhibition of parasitemia in relation to non-treated infected mice at day 8 after malaria infection.

Dose (mg/kg)	Tormentic acid	β -sitosterol	Chloroquine
15	58%*	51%	100%
10	35%	20%	76%

* Inhibition of the growth of $\geq 20\%$ indicates antimalarial activity see footnote table 3.

Table 6 – Antimalarial activity of tormentic acid extracted from *Cecropia pachystachya* roots fractions, evaluated against blood parasites of *Plasmodium falciparum*, W2 chloroquine resistant strain, through the hypoxanthine test.

Dose	% Parasitemia reduction			
	Tormentic acid ($\mu\text{g/mL}$)		Chloroquine* ng/mL	
	Exp 1	Exp 2	Exp 1	Exp 2
100	ND	98	ND	97
50	83	88	97	97
25	60	81	97	97
12.5	43	42	96	97
6.1	27	14	56	49
3.1	9	0	0	14
1.5	0	0	0	0
0.8	0	ND	0	ND
IC ₅₀	15.1	11.4	~60 ng	~60 ng

ND = Not determined

* Chloroquine is used in parallel as a control antimalarial drug; first dilution is 1000 ng/ml.

Tabela 7 – Antimalarial activities of tormentic acid and β -sitosterol extracted from *Cecropia pachystachya* root wood fractions, tested against *Plasmodium falciparum*, strain W2, evaluated in parallel with the antimalarial chloroquine (doses in ng/ml), by the traditional method.

Dose ($\mu\text{g/mL}$)	Parasitemia reduction (%)		
	Tormentic acid	β -sitosterol	Chloroquine*
100	100	71**	100
50	100	17	100
25	91,6	42	100
12,5	81,3	23	100
6.12	56,3	46	81
3.06	20,8	0	58
1.50	0	8	0

* Doses in ng/ml (first dilution is 1000ng/ml) tested in parallel with the compounds.

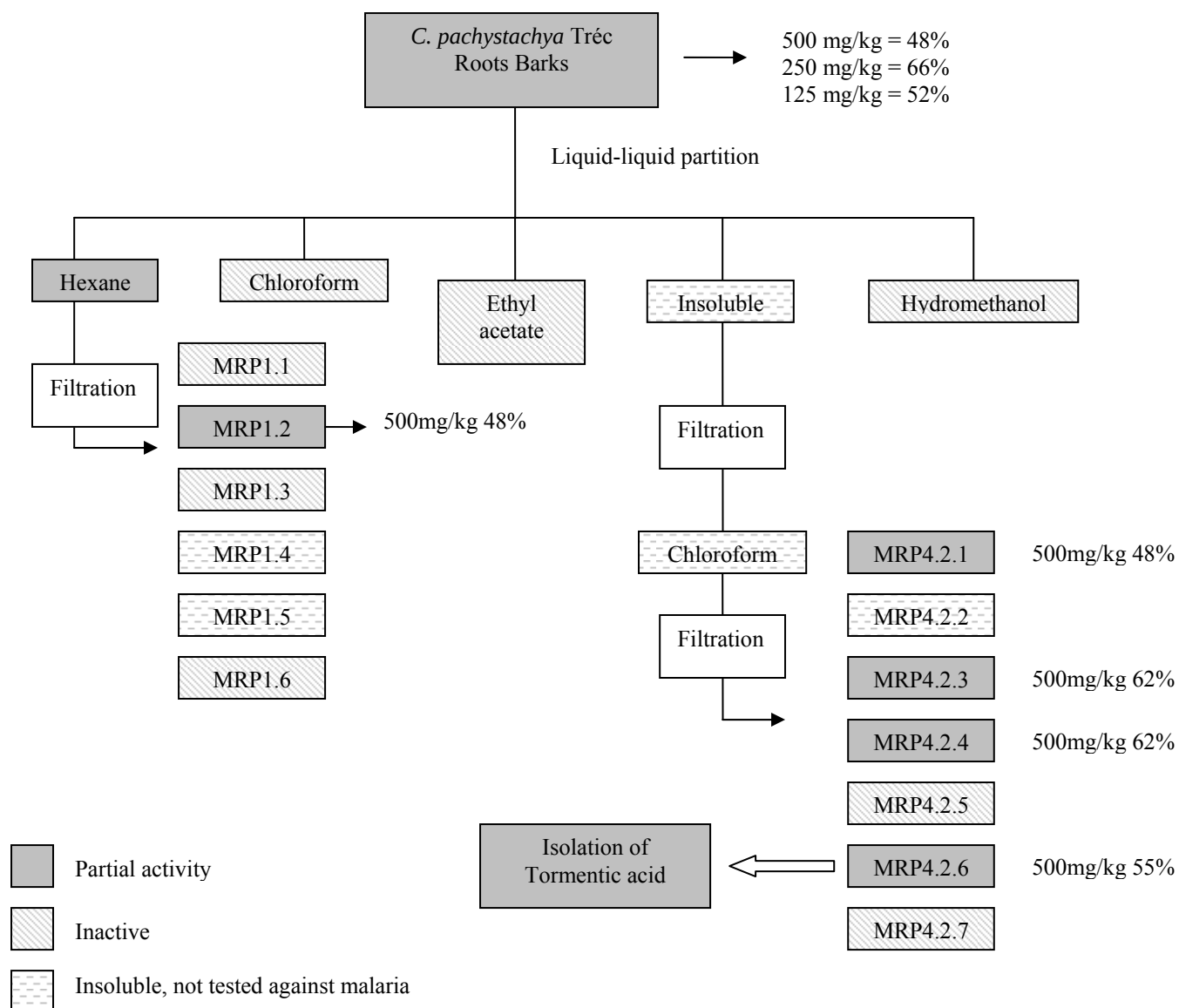
** There was no dose response to β -sitosterol, thus considered of borderline activity.

TABLE 8 - Antimalarial activity of *Cecropia pachystachia* ethanol extracts, maintained refrigerated (AA) for seven years, or freshly obtained (AN), measured against *P. falciparum* (W2 strain) in ELISA-HRP2 or by hypoxanthine incorporation, determined through the minimal inhibitory dose (IC₅₀). The cytotoxicity dose against the HepG2 hepatoma cells allowed to evaluating the selectivity index (SI) of the compounds.

Extract code	Plant parts used	IC ₅₀ (µg/ml) ELISA-HRP2	IC ₅₀ (µg/ml) Hypoxanthine	Citotoxicity (ED ₅₀) µg/ml	Selectivity index (SI)
AA 1	Wood bark	11.7 / 5.6	10.8	507	58.1
AA 3	Root bark	8.7	24/36	348	16.5
AA 5	Root wood	<10 / 1.9	7.5/2.6	>1000	>529.1
AA 6	Wood	7.9 / 4.9	14/24	>1000	>155.2
AN 10	Root bark	8.5 / 6.4 / 4.2	10.6/11.7	414	64.9
AN 12	Wood	4.7/3.9	5.2/6.2	ND	ND
AN 13	Wood bark	24.6	>50	>1000	>40.5
CQ	(Chloroquine as a control)	93.8	62	>1000	>85

HRP2= histidine-rich protein expressed by the parasite.

AA = Old frozen samples (obtained in March 2002); AN= new samples (obtained in March 2009). ND= not determined



Note: The fractions MRP1.2; MPR4.2.1; MRP4.2.2 provided β -sitosterol.

Figure 1. Phytochemical studies and bioguided characterization of *Cecropia pachystachya* tested against malaria parasites in vivo and in vitro, some with consistent activity.

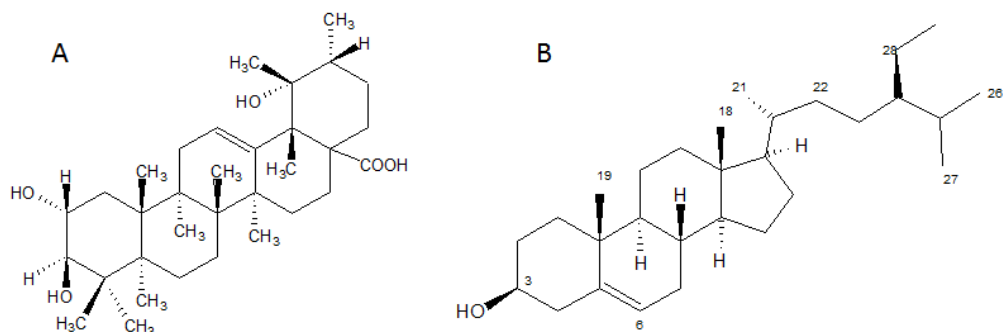


Figure 2 – Tormentic acid (A) and β -Sitosterol (B) compounds

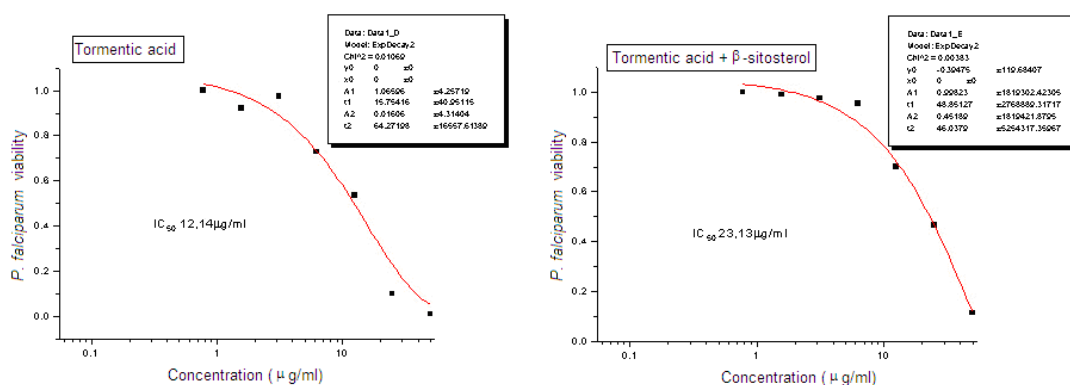


Figure 3. The dose-response effect of tormentic acid (A) and of the mixture tormentic acid and β -sitosterol (1:1) (B), tested in parallel against the *Plasmodium falciparum* W2 strain chloroquine resistant. Each point represents the mean of triplicates in the same test.

Legends for Figures

Figure 1. Phytochemical studies and bioguided characterization of *Cecropia pachystachya* tested *in vivo* against *P. berghei* malaria parasites. and *in vitro* against *P. falciparum* data

Figure 2 – Tormentic acid (A) and β -sitosterol (B) compounds

Figure 3. The dose-response effect of tormentic acid (A) and of the mixture tormentic acid and β -sitosterol (1:1) (B), tested in parallel against the *Plasmodium falciparum* W2 strain chloroquine resistant. Each point represents the mean of triplicates in the same test.

CAPÍTULO 5

**Capacidade sequestrante de radicais livres dos extratos das cascas do caule e
folhas da *Ximenia americana* L.**

(Artigo a ser submetido à Food Chemistry)

Capacidade sequestrante de radicais livres dos extratos das cascas do caule e folhas da
***Ximenia americana* L.**

Valdiléia Teixeira Uchôa^a, Josiane S de Luna^c, Cleyton Marcos de M. Sousa^b, Adonias Almeida
Carvalho^b, Mariana H. Chaves^b, Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana^{a*}

^aInstituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal do Alagoas, 57072-970, Maceió (AL) –Brasil.

^bDepartamento de Química, Universidade Federal do Piauí, 64049-550, Teresina (PI) – Brasil.

^cEscola Agrotécnica Federal de Satuba, 57120-000, Satuba (AL) - Brasil

*Corresponding author: Tel.: 55-82-3214-1388, Fax: 55-82-3214-1384

E-mail address: aegs@qui.ufal.br

Resumo

Os antioxidantes são agentes responsáveis pela inibição e redução das lesões causadas pelos radicais livres nas células. Extratos, frações e compostos da *Ximenia americana* L., foram submetidos ao teste de atividade sequestrante de radicais *in vitro* pelo método do DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila). Os valores de CE₅₀ (concentração efetiva em 50%) dos extratos, frações e compostos foram calculados e os resultados indicam que as frações em acetato de etila da casca do caule e das folhas, apresentaram capacidade sequestrante de radical e um alto teor de fenóis totais. A alta atividade sequestrante de radical destas frações é justificada pela presença respectiva dos flavonóides epicatequina e quercetina.

Palavras-Chave: Antioxidante, DPPH, *Ximenia americana*

Abstract

Antioxidants are agents responsible for the inhibition and reduction of damage caused by free radicals in cells. Extracts, fractions and compounds of *Ximenia americana* L., were evaluated with the “in vitro” test for the antioxidant activity by DPPH method (2,2-diphenyl-1-picrilhidrazil). The EC₅₀ values of the extracts, fractions and compounds were calculated and the results indicate that the ethyl acetate fraction of the stem bark and leaves are active for the antioxidant activity and has high content of total phenols. The high antioxidant activity of these fractions is justified by the presence of epicatechin and quercetin, respectively.

Keywords: Antioxidant, DPPH, *Ximenia americana*

1. Introdução

Danos oxidativos irreversíveis de proteínas, carboidratos, lipídeos e ácidos nucleicos são alguns dos fatores responsáveis pelo desenvolvimento de numerosas doenças degenerativas tais como: aterosclerose, mal de Parkinson, mal de Alzheimer, doenças cardiovasculares, câncer e diabetes (Lodyato et al., 2004). Os frutos e os vegetais são importantes na dieta humana por apresentarem componentes antioxidantes que protegem contra os radicais livres e têm sido associados a redução de risco dessas doenças degenerativas (Zhang & Hamauzu, 2004).

Os compostos responsáveis pela ação antioxidante são de origem endógena como as enzimas e proteínas e exógena como as substâncias de baixa massa molecular tais como: vitaminas, carotenóides, flavonóides, antocianinas e outros compostos fenólicos muito comuns em plantas (Argolo et al., 2004; Zhang & Hamauzu, 2004).

Vários métodos têm sido desenvolvidos para determinar a capacidade antioxidante de substâncias puras e extratos de plantas. Um dos métodos mais usados envolve a medida do seqüestro de radicais livres tais como o radical ácido 2,2'-azino-bis (etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS⁺), o 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH), ou outros radicais coloridos (Soler-Rivas et al, 2000).

Dois parâmetros bastante utilizados para determinar a capacidade seqüestradora de radicais livres por uma amostra são a concentração efetiva em 50% (CE₅₀), quantidade de antioxidante necessária para diminuir a concentração inicial do radical DPPH em 50%, e o percentual de inibição, porcentagem total do radical DPPH que reagiu com a amostra antioxidante no estado estacionário (Sanchez-Moreno et al, 1998).

A *Ximenia americana* é um arbusto com espinhos, pertencente à família Olacaceae, encontrada em regiões tropicais da América e África (Pott & Pott, 1994). É conhecida popularmente no Brasil como ameixa-da-baia, ameixa-da-terra, ameixa-de-espinho e sândalo-do-brasil (Braga, 1960). Todas as partes desta planta têm indicações de uso na medicina popular

(James et al., 2008, Braga, 1960). As raízes têm propriedades anti-sépticas e também são usadas no tratamento de febres, icterícias e cefaléias. As folhas têm ação laxante e são indicadas na cura do sarampo (Omer & Elnima, 2003). O caule pulverizado é recomendado para cicatrização de úlceras, como depurativo, regulador menstrual e na perturbação gástrica. A infusão das flores é empregada para diminuir a diarreia com sangue (Braga, 1960). Esta planta também atua contra o reumatismo, câncer e muitas infecções (Mevy et al, 2006). Estudo farmacológico da *X. americana* indica que esta espécie apresenta atividade anticancer e antineoplásica (Voss, et al., 2006), antimicrobiana (Geyid et al., 2005; Omer & Elimina, 2003), antibacteriana (Koné et al., 2004) e pesticida (Fatope et al., 2000).

Neste trabalho foi avaliada a atividade sequestrante de radical e determinado o teor de fenóis totais dos extratos etanólicos (EtOH) das cascas, da madeira do caule e das folhas da *Ximenia americana*, bem como das frações obtidas da partição líquido-líquido dos extratos. Adicionalmente realizou-se o fracionamento monitorado da fração em acetato de etila das cascas do caule e folhas resultando no isolamento dos flavanóides epicatequina e quercetina.

2. Materiais e métodos

2.1. Procedimentos experimentais gerais

Os solventes e reagentes utilizados na preparação dos extratos e fracionamentos, foram todos de grau analítico (PA) obtidos da Vetec, Merck e Ecibra. As análises comparativas foram realizadas através cromatografia em camada delgada (CCD) utilizando se placas com gel de sílica 60 F₂₅₄ (20 x 20 cm, 0,2 mm) adquiridas da Merck (Darmstadt, Alemanha). As separações cromatográficas em coluna (CC) foram realizadas utilizando-se como suporte gel de sílica 60 (70-230 Mesh) da Merck (Darmstadt Alemanha) e Sephadex LH-20 da Pharmacia (Upsala, Suécia). As placas de CCD foram reveladas por irradiação com luz no UV (λ 254 nm), por exposição a vapores de I₂ ou por borrifação com solução de anisaldeído (50% ácido acético) ou

solução ácida de Sulfato Cérico (10% Ácido Sulfúrico), seguida de aquecimento em estufa a 80 °C por 15 min.

2.2. Material vegetal

O caule e as folhas da espécie *Ximenia americana* L. foram coletados em abril de 2002 no município de Campo Maior- PI e identificada pela Dra. Maria Edilene Alencar. Uma exsicata foi depositada sob o número TEPB 14407 no Herbário Grasiela Barroso da Universidade Federal do Piauí.

2.3. Extração e fracionamento da planta

O caule e as folhas da *X. americana* foram coletados, separados e secos à temperatura ambiente (26 ± 1 °C) ao abrigo da luz. A casca do caule (3,3 kg), madeira do caule (2,5 kg) e folhas (1,5 kg), foram triturados, em moinho tipo forrageira (Nogueira Itapira – SP, mesh 2 mm), e extraídos com etanol 95%, por 3 vezes consecutivas em um extrator de aço inoxidável a temperatura de 26 ± 1 °C. Após concentração em evaporador rotatório a baixa pressão e eliminação da umidade residual por liofilização, foram obtidos os extratos EtOH da casca do caule (620 g, 18%), madeira do caule (250 g, 10%) e folha (230 g, 15%).

Os extratos EtOH da casca do caule (500 g) e folhas (210 g) da *X. americana* foram suspensos em mistura de MeOH/H₂O (2:3) submetidos a processo de partição líquido-líquido sucessivamente com C₆H₁₄ (3 x 700 mL), CHCl₃ (3 x 700 mL) e AcOEt (3 x 700 mL). Após remoção do solvente à baixa pressão em evaporador rotatório e liofilização da fração hidrometanólica foram obtidas quatro frações do extrato EtOH das folhas: C₆H₁₄ (15,5 g; 7,4%), CHCl₃ (7,5 g; 3,2%), AcOEt (80,9 g; 38,5%) e MeOH/H₂O (101 g, 48%) e quatro frações do extrato da casca do caule: C₆H₁₄ (10,75 g; 1,7%), CHCl₃ (7,2 g; 1,2%), AcOEt (220 g; 45%) e

MeOH/H₂O (240,4 g; 48%). Os extratos brutos em EtOH e frações resultantes da partição foram submetidas a ensaios da atividade antioxidante *in vitro*.

2.4. Isolamento fitoquímico

A fração em AcOEt (200,0 g) da casca do caule, foi submetida a cromatografia em coluna de gel de sílica desativada com água a 10% (800 g) eluída com acetato de etila e metanol. Foram obtidas três subfrações pela passagem de 1000mL de cada solvente para cada fração: **C1**-AcOEt (46,54 g, 23,2%), **C2**-AcOEt (29,11 g, 14,5%) e **C3**-MeOH (76,66 g, 38%).

Uma alíquota da subfração **C1**-AcOEt (40,0 g) foi submetida a cromatografia em coluna de gel de sílica (300 g). Foram coletadas 7 frações de 500 mL empregando-se como eluentes CHCl₃, MeOH e misturas destes.

A fração CHCl₃:MeOH 20% (17 g, 42,5%) forneceu, após remoção do solvente, um sólido amorfo de cor vinho. Parte deste material (3,5g) foi submetido, a um processo de cristalização em éter etílico e acetato de etila 1:1, por três vezes consecutivas fornecendo a epicatequina (1 g, 28%).

A fração AcOEt (70 g) das folhas, foi submetida a cromatografia em carvão ativo em um funil de Buchner. Foram obtidas seis frações pela passagem de 1000 mL de cada um dos seguintes solventes os quais após serem eliminados forneceu as seguintes frações, H₂O (40 g, 57%), EtOH/H₂O 1:1 (10 g, 14%), EtOH (7 g, 10%), AcOEt (5 g, 7%), CHCl₃ (2 g, 3%) e C₆H₁₄ (2 g, 3%).

A fração em AcOEt (3 g), foi submetida a cromatografia em coluna de gel de sílica (30 g) e eluída com mistura de CHCl₃, e MeOH. Foram coletadas 35 frações de 30 mL cada, as quais foram analisadas por cromatografia em camada delgada de sílica (CCD) e agrupadas. As frações 17-24 (1,5 g, 50%) foram reunidas e purificadas em coluna de Sephadex LH-20 usando como

solvente o MeOH. Este procedimento foi repetido 2 vezes e levou ao isolamento da quercetina **(2)** (1 g, 66.6%).

2.5. Determinação de fenóis totais

A determinação do teor de fenóis totais presentes nas amostras de extrato etanólico da *X. americana* foi feita por meio de espectroscopia na região do visível pelo método espectrofotométrico usado o reagente de Folin–Ciocalteu com modificações (Bonoli et al., 2004; Sousa et al., 2007). O extrato etanólico (100 mg) foi dissolvido em metanol, transferido quantitativamente para um balão volumétrico de 100 mL e o volume final foi completado com metanol. Uma alíquota de 7,5 mL desta solução foi transferida para um balão volumétrico de 50 mL; esta segunda solução teve seu volume acertado novamente com metanol. Uma alíquota de 100 µL desta última solução foi agitada com 500 µL do reagente de Folin-Ciocalteu e 6 mL de água destilada por 1 min; passado este tempo 2 mL de Na₂CO₃ a 15% foram adicionados à mistura e agitada por 30 s. A solução teve seu volume acertado para 10 mL com água destilada. Após 2 h, a absorvância das amostras foi medida a 750 nm utilizando-se cubetas de vidro, tendo como “branco” o metanol e todos os reagentes, menos o extrato.

O teor de fenóis totais (FT) foi determinado por interpolação da absorvância das amostras contra uma curva de calibração construída com padrões de ácido gálico (10 a 350 µg/mL) e expressos como mg de EAG (equivalentes de ácido gálico) por g de extrato. A equação da curva de calibração do ácido gálico foi $C = 809,0200A + 5,0827$, onde C é a concentração do ácido gálico, A é a absorvância a 750 nm e coeficiente de correlação $R = 0,999$. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

2.6. Análise quantitativa da atividade antioxidante

A avaliação quantitativa da atividade sequestrante de radical foi feita seguindo metodologia descrita na literatura (Brand-Williams et al., 1995; Sánchez-Moreno et al., 1998), com pequenas modificações, monitorando-se o consumo do radical livre DPPH pelas amostras, através da medida do decréscimo da absorvância de soluções de diferentes concentrações. Estas medidas foram feitas em espectrofotômetro UV-Vis no comprimento de onda 516 nm, tendo como controles positivos rutina e ácido gálico.

2.7. Construção da curva de calibração do DPPH

Primeiramente, foram preparados 50 mL de solução estoque de DPPH em metanol na concentração de 40 µg/mL, mantida sob refrigeração e protegida da luz. Foram feitas diluições de 35, 30, 25, 20, 15, 10, 5 e 1 µg/mL. A curva de calibração foi construída a partir dos valores da absorvância a 516 nm de todas as soluções (1 a 40 µg/mL), medidas em cubetas de vidro com percurso óptico de 1 cm e tendo como “branco” o metanol. As medidas de absorvância foram efetuadas em triplicata e em intervalos de 1 min entre cada leitura. A equação da curva de calibração do DPPH foi $C = 35,846A - 0,230$, onde C corresponde à concentração de DPPH no meio, A é a absorvância medida no comprimento de onda de 516 nm e o coeficiente de correlação $R = 0,9997$.

2.8. Leitura das medidas de absorvância nas amostras

Soluções dos extratos EtOH, frações da partição e substâncias isoladas (500 µg/mL) e dos controles positivos em metanol foram diluídas nas concentrações de 250, 200, 150, 100, 50 e 25 µg/mL. As medidas das absorvâncias das misturas reacionais (0,3 mL da solução da amostra ou do controle positivo e 2,7 mL da solução estoque de DPPH na concentração de 40 µg/mL)

foram feitas a 516 nm, no 1º, 5º e 10º min, a cada 10 min até completar 1 h. A mistura de metanol (2,7 mL) e solução metanólica do extrato (0,3 mL) foi utilizada como branco.

A partir da equação da curva de calibração e dos valores de absorvância no tempo de 30 min para cada concentração testada, foram determinados os percentuais de DPPH remanescentes (% DPPH_{REM}), conforme a equação:

$$\%DPPH_{REM} = [DPPH]_{T=t} / [DPPH]_{T=0} \times 100$$

onde $[DPPH]_{T=t}$ corresponde à concentração de DPPH no meio, após a reação com as amostras e $[DPPH]_{T=0}$ é a concentração inicial de DPPH, ou seja, 40 mg/mL (100 µmol/mL) (Brand-Williams, 1995; Sánchez-Moreno, et al., 1998; Soler-Rivas et al, 2000).

A concentração eficiente, quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% (CE₅₀), foi determinada usando o programa Microcal Origin 7.5, a partir de uma curva exponencial de primeira ordem, obtida plotando-se na abscissa as concentrações da amostra (µg/mL) ou do controle positivo e na ordenada, a porcentagem de DPPH remanescente (% DPPH_{REM}) (Sánchez-Moreno, et al., 1998). Os valores de absorvância em todas as concentrações testadas, no tempo de 30 min, foram também convertidos em percentual de inibição do DPPH (PI), determinada pela equação:

$$PI = \{ [Abs_{DPPH} - (Abs_{amostra} - Abs_{branco})] \times 100 \} / Abs_{DPPH}$$

onde Abs_{DPPH} é a absorvância inicial da solução metanólica de DPPH e $Abs_{amostra}$ é a absorvância da mistura reacional (DPPH+amostra) (Yen & Duh, 1994; Sousa et al., 2007).

2.9. Análise estatística

Os resultados apresentados neste estudo correspondem à média de três repetições (n=3) ± desvio padrão da média. Foram considerados estatisticamente diferentes os resultados de atividade antioxidante que apresentaram probabilidade de ocorrência da hipótese de nulidade

menor que 5% ($P < 0,05$) aplicando-se ANOVA, seguido de comparações múltiplas pelo teste de Tukey. Todas as análises foram realizadas usando o programa Microcal Origin 7.5 e SPSS 9.0.

3. Resultados e discussão

3.1. Identificação estrutural das substâncias isoladas

A substância **1** (Figura 1), é um sólido amorfo, de cor marron, Pf 239 °C (EtOH) e $[\alpha]_D^{29} -45$ ($c = 1,0$ MeOH). O espectro no IV mostrou uma intensa absorção em 3502 e 3412 cm^{-1} (O-H). No espectro RMN ^1H quatro dupletos em δ 7,00 ($J = 1,7$ Hz), 5,94 ($J = 2,3$ Hz), 5,97 ($J = 2,3$ Hz) e 4,83 ($J = 7,54$ Hz) foram atribuído aos prótons H-2', H-8, H-6 e H-2. Os duplos dupletos em δ 2,88 ($J = 4,5$ e 16,7 Hz) e δ 2,76 ($J = 2,7$ e 16,7 Hz) foram atribuídos aos prótons CH_2 do H-4. Os sinais referente a dois prótons em δ 6,78 (d, $J = 8,2$) e 6,82 (dd, $J = 1,7$ e 8,2) e para um próton em δ 4,20 (m, $J = 8,2$) foram atribuídos aos prótons H-5', H-6' e H-3. O espectro de massas indicou um fragmento de massa m/z pico 288 que corresponde ao pico do íon molecular, confirmando a fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_6$. A análise conjunta dos dados espectroscópicos uni e bidimensionais permitem propor a estrutura da epicatequina para o composto **1**.

A substância **2** (Figura 1) é um sólido de cor amarela, Pf 312 °C (EtOH). O espectro no IV mostrou uma intensa absorção a 3420 e 1725 cm^{-1} , indicando a presença de grupos hidroxila e carbonila, respectivamente. O espectro RMN ^1H mostrou um duplo duplete a δ 7,64 ($J = 8,5$ e 2,2 Hz) atribuído a H-6', um duplete a δ 7,74 ($J = 2,2$ Hz) referente a H-2' e três dupletos a δ 6,89 ($J = 8,5$ Hz), 6,39 ($J = 2,0$ Hz) e 6,20 ($J = 2,0$ Hz) atribuídos aos prótons H-5', H-8 e H-6 respectivamente. O espectro de massas indicou pico do íon molecular de 303 u.m.a. confirmando a fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$. A análise conjunta dos dados espectroscópicos uni e bidimensionais nos leva a propor a estrutura da quercetina para o composto **2**.

3.2. Atividade sequestrante de radicais *in vitro*

A atividade sequestrante de radical, expressa em percentual de inibição (PI), exibida pelos extratos etanólicos das cascas do caule, da madeira do caule e das folhas da *X. americana*, nas concentrações de 250, 200, 150, 100, 50 e 25 µg/mL encontra-se na Figura 2. Com base nestes dados, evidencia-se que os extratos etanólicos das folhas, casca e madeira do caule de *X. americana*, contêm substâncias que atuam como doador de hidrogênio ao radical DPPH, entretanto esta ação é diferenciada entre eles.

O extrato EtOH da casca do caule, apresentou maior atividade sequestrante de radical em todas as concentrações, sendo o mais eficaz em seqüestrar o radical DPPH, atingindo um percentual de inibição, superior a 90% na concentração de 100 µg/mL. O extrato EtOH da madeira do caule apresentou PI = 78,29% na concentração de 250 µg/mL, exibindo uma menor capacidade em seqüestrar o radical DPPH.

O extrato das folhas, apresentou atividade sequestrante de radical maior que o extrato da madeira do caule e menor que o extrato da casca do caule em todas as concentrações testadas. A comparação dos percentuais de inibição dos extratos com o composto controle positivo rutina, mostrou que o extrato da casca do caule apresentou atividade sequestrante de radical comparável ao controle, conforme a Figura 2.

Na concentração de 100 µg/mL, os extratos EtOH da casca do caule, das folhas e madeira do caule, apresentaram percentagem de inibição do radical DPPH de $94,75\% \pm 0,27$; $57,27\% \pm 4,20$ e $42,83\% \pm 2,43$, respectivamente. O extrato da madeira do caule por ser o de menor atividade não foi fracionado.

As frações em C₆H₁₄, CHCl₃, AcOEt e MeOH/H₂O, oriundas da partição líquido-líquido dos extratos da casca do caule e folhas, foram submetidos a ensaios antioxidantes quantitativos.

As frações em C₆H₁₄ dos extratos etanólicos das cascas do caule e folhas, apresentaram baixa porcentagem de inibição do radical DPPH, mostrando-se pobres em compostos

antioxidantes. As frações em AcOEt da casca do caule e folhas, na concentração 100 µg/mL, reduziram o DPPH em $93,49\% \pm 2,85$ e $92,33\% \pm 3,12$, respectivamente, sendo estas frações as mais ativas conforme indicado na Figura 3.

Levando-se em consideração a análise estatística dos dados de atividade sequestrante de radical em todas as concentrações testadas (25, 50, 100, 150, 200 e 250 µg/mL), aplicando-se ANOVA e teste de Tukey, verificou-se que o extrato etanólico da casca do caule apresentou diferença significativa ($P < 0,05$) com relação aos extratos etanólicos da madeira do caule e folhas e não apresentou diferença significativa ($P < 0,05$) como fontes de substâncias seqüestradoras de radicais livres, com relação ao controle positivo rutina.

Das frações em AcOEt foram isolados os flavanóides epicatequina (1) das cascas do caule e a quercetina (2) das folhas. Na concentração de 50 µg/mL, os compostos isolados, epicatequina (1) e quercetina (2) e controles positivos ácido gálico e rutina apresentaram porcentagem de inibição do DPPH de $93,84\% \pm 0,13$; $62,62\% \pm 2,5$; $83,59\% \pm 3,7$ e $64,4\% \pm 3,73$ respectivamente conforme a Figura 4.

O comportamento cinético da reação do DPPH com cada extrato ou controle, na concentração de 100 µg/mL, é mostrado na Figura 5, através da curva de dose-resposta relativa ao decréscimo da % DPPH_{REM} em função do tempo (min). Pode se verificar que quase todas as amostras, reduziram a concentração inicial de DPPH à metade, antes do primeiro minuto de análise, comportamento comparável ao controle positivo (rutina), portanto pode ser classificado como um antioxidante de cinética rápida (0 a 5 min). Apenas as amostras do extrato etanólico e fração hidrometanólicos das folhas, são consideradas como antioxidantes de cinética lenta (após 30 min).

Observa-se que a ordem crescente de velocidade da ação seqüestradora foi: controle rutina < extrato EtOH (casca do caule) < frações AcOEt (folhas) < frações AcOEt (casca do caule) < MeOH/H₂O (casca do caule) < epicatequina < quercetina, conforme a Tabela 1. A CE₅₀

é um parâmetro muito utilizado para determinar o poder antioxidante de extratos ou substâncias, podendo-se afirmar que quanto menor o valor de CE_{50} , maior o poder de sequestrar radicais livres (Sanchez-Moreno et al., 1998).

Os valores de CE_{50} , dos extratos, frações e compostos da *X. americana*, foram calculados e os resultados indicam que as frações em acetato de etila da casca do caule ($29,62 \mu\text{g/mL} \pm 3,00$) e folhas ($33,03 \mu\text{g/mL} \pm 2,66$) de *X. americana*, são menores do que os valores dos compostos padrões rutina ($31,93 \mu\text{g/mL} \pm 0,52$) e ácido gálico ($24,90 \mu\text{g/mL} \pm 0,04$). A alta atividade sequestrante de radical destas frações pode ser justificada pela presença da epicatequina (**1**) ($34,64 \mu\text{g/mL} \pm 3,00$) e quercetina (**2**) ($16,40 \mu\text{g/mL} \pm 1,30$).

Mesmo que os extratos apresentem compostos majoritários como a quercetina (folhas) e a epicatequina (casca do caule), não é possível inferir com precisão que sejam só estes compostos os responsáveis pela ação observada, já que o extrato bruto da casca do caule e fração AcOEt das folhas apresentam resultado semelhante ao composto epicatequina.

A determinação de fenóis totais é um método indireto de avaliação da atividade antioxidante e fornece informações importantes que podem caracterizar os produtos naturais como fonte de substâncias sequestradoras de radicais livres (Roginsky & Lissi, 2005). Dentre os diversos métodos desenvolvidos para a quantificação de compostos fenólicos, o método do reagente de Folin-Ciocalteu tem sido bastante utilizado (Atoui et al., 2005).

Os resultados da análise dos fenóis totais representam o comportamento da análise da ação antioxidante. O extrato etanólico da casca do caule e as frações AcOEt, MeOH/H₂O e CHCl₃, possuem o teor de fenóis de 678,66; 878,47; 736,84 e 243,51 mg de EAG (Equivalentes de Ácido Gálico) respectivamente. Já o extrato etanólico das folhas e as frações em AcOEt, MeOH/H₂O e CHCl₃ possuem teor de fenóis de 665,37; 662,24; 625,26 e 449,76 mg de EAG respectivamente, conforme a Tabela 1. Através destes resultados pode-se observar que estas amostras avaliadas apresentaram elevado percentual de compostos fenólicos. O maior teor de

fenóis totais para o extrato etanólico da casca do caule foi registrado para a fração em acetato de etila enquanto que para o extrato etanólico das folhas a melhor atividade foi observada para o extrato bruto que é semelhante ao do extrato em acetato de etila. As frações em clorofórmio tanto da casca do caule quanto das folhas apresentaram o menor teor de fenóis totais, de acordo com a menor atividade observada frente ao teste do DPPH (Figura 03).

4. Conclusão

Nesse trabalho, as folhas e cascas do caule da *Ximenia americana* apresentaram alta atividade sequestrante radicalar pelo método fotocolorimétrico do DPPH e alto teor de fenóis totais pelo ensaio espectrofotométrico com o reagente Folin-Ciocalteu. As folhas apresentaram melhor resultado, provavelmente por apresentar em sua composição química os flavonóides epicatequina e quercetina em grande quantidade.

5. Referências

- Argolo, A. C. C., Sant'ana, A. E. G., Pletsch, M. & Coelho, L. C. B. B. (2004). Antioxidant activity of leaf extracts from *Bauhinia monandra*, *Bioresource Technology*, 95, 229-233.
- Atoui, A. K., Mansouri, A., Boskou, G. & Kefalas, P. (2005). Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile, *Journal of Agricultura Food Chemistry*, 89, 27-36.
- Bonoli, M., Verardo, V., Marconi, E. & Caboni, M. F. (2004). Antioxidative phenols in barley (*Hordeum vulgare* L.) flour: comparative spectrophotometric study among extraction methods of free and bound phenolic compouds, *Journal of Agricultura Food Chemistry*, 52, 5195-5200.
- Braga, R. (1960). *Plantas do Nordeste, Especialmente do Ceará*. Natal, Ed. Universitária.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *Food Science and Technology*, 28, 25-30.

Fatope, M. O., Adoum, O. A. & Takeda, Y. (2000). C18 Acetylenic Fatty Acids of *Ximenia americana* with Potential Pesticidal Activity. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 48, 1872-1874.

Geyid, A., Abebe, D., Debella, A., Makonnen, Z., Abera, F., Teka, F., Kebede, T., Urga, K., Yersaw, K., Biza, T., Mariam, B. H. & Guta, M. (2005). Screening of some medicinal plants of Ethiopia for their anti-microbial properties and chemical profiles, *Journal of Ethnopharmacology*, 97, 421–427.

James, D. B., Owolabi, A. O., Ibiyeye, H., Magaji, J., Ikugiyi, Y. A. (2008). Assessment of the hepatic effects, heamatological effect and some phytochemical constituents of *Ximenia americana* (Leaves, stem and root) extracts, *African Journal of Biotechnology*, 7, 4274-4278.

Koné, W.M., Atindehou, K. K., Terreaux, C., Hostettmann, K., Traoré, D. & Dosso, M. (2004). Traditional medicine in North Côte-d'Ivoire: screening of 50 medicinal plants for antibacterial activity, *Journal of Ethnopharmacology*, 93, 43–49.

Lodyato, V. I., Yurkova, I. L., Sorokin, V. L., Shadyro, O. I., Dolgopalets & Kisel, A. M. (2004). Novel (3,5-di-tert-butyl-2-hydroxy-phenylcarbamoyl)-alkanoic acids as potent antioxidants, *Biorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 14, 4253-4256.

Mevy, J. P., Bessiere, J. M., Greff, S., Zombre, G. & Viano, J. (2006). Composition of the volatile oil from the leaves of *Ximenia americana* L, *Biochemical Systematics and Ecology*, 34, 549-553.

Omer, M. E. F. A. & Elnima, E. I. (2003). Antimicrobial Activity of *Ximenia americana*; *Fitoterapia*, 74, 122-126.

Pott, A. & Pott, V. J. (1994). *Plantas do Pantanal*; Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro de Pesquisa Agropecuária do Pantanal, Corumbá – Mato Grosso.

Sánchez-Moreno, C., Larrauri, J. A. & Saura-Calixto. (1998). A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols, *Journal Science Food Agricultural*, 76, 270-276.

Soler-Rivas, C., Espín, J. C. & Wichers, H. J. (2000) An easy and fast test to compare total free radical scavenger capacity of foodstuffs, *Phytochemical Analysis*, 11, 1-9.

Sousa, C. M. de M., Silva, H. R., Vieira-Júnior, G. M., Ayres, M. C. C., Da Costa, C. L. S., Araújo, D. S., Cavalcante, L. C. D., Barros, E. D. S., Araújo, P. B. de M., Brandão, M. S. & Chaves, M. H. (2007). Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais, *Química. Nova*, 30, 351-355.

Roginsky, V. & Lissi, E. A. (2005). Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food, *Food Chemistry*, 92, 235-234.

Voss, C., Eyol, E., Frank, M., Von Der Lieth, C. W. & Berger, M. R. (2006). Identification and characterization of riproximin, a new type II ribosome-inactivating protein with antineoplastic activity from *Ximenia Americana*, *The FASEB Journal*, 20, 334-345.

Zhang, D. & Hamauzu, Y. (2004). Phenolics, ascorbic acid, carotenoids and antioxidant activity of broccoli and their changes during conventional and microwave cooking, *Food Chemistry*, 88, 503-509.

Yen, G.C. & Duh, P.D. (1994). Scavenging effect of methanolic extracts of peanut hulls on free-radical and active-oxygen species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 629–632.

Legenda para figura:

Autores:

Valdiléia Teixeira Uchôa¹, Josiane S. Luna¹, Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana^{1*}, Cleyton Marcos de M. Sousa², Adonias Almeida Carvalho², Mariana H. Chaves².

¹Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal do Alagoas, 57072-970 Maceió – AL

²Departamento de Química, Universidade Federal do Piauí, 64049-550 Teresina – PI

Figura 1. Substância isoladas do extrato EtOH da *X. americana*

Figura 2. Atividade antioxidante dos extratos EtOH da *Ximenia americana* versus rutina (grupo controle)

Figura 3. Atividade antioxidante das frações dos extratos etanólicos das folhas e casca do caule da *X. americana*

Figura 4. Atividade antioxidante dos compostos isolados da *X. americana* e controles na concentração de 50 µg/mL

Legenda para Tabela:

Tabela 1. Conteúdo de fenóis totais (FT) e atividade antioxidante (CE₅₀) dos extratos EtOH e frações da *Ximenia americana*

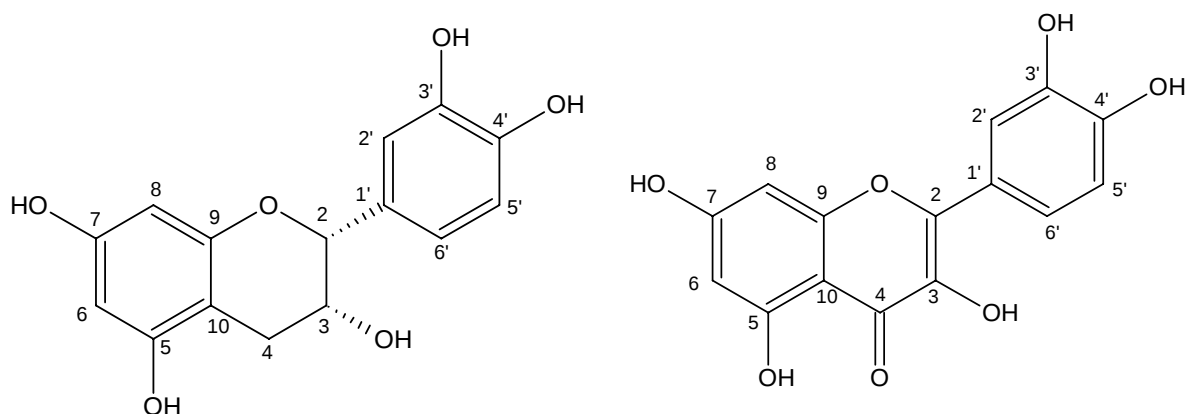


Figura 1. Substância isoladas do extrato EtOH da *X. americana*

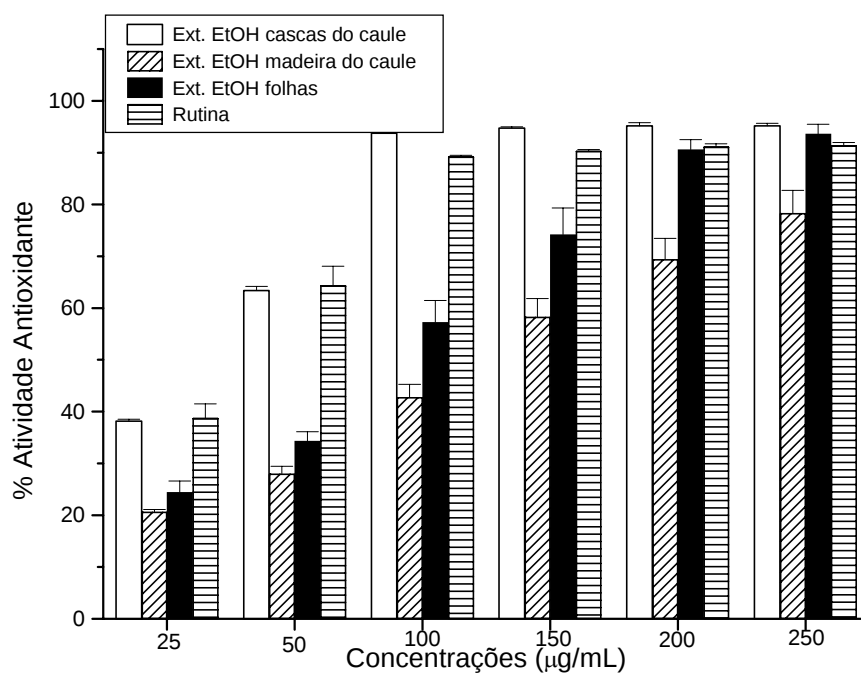


Figura 2. Atividade antioxidante dos extratos EtOH da *Ximenia americana* versus rutina (grupo controle)

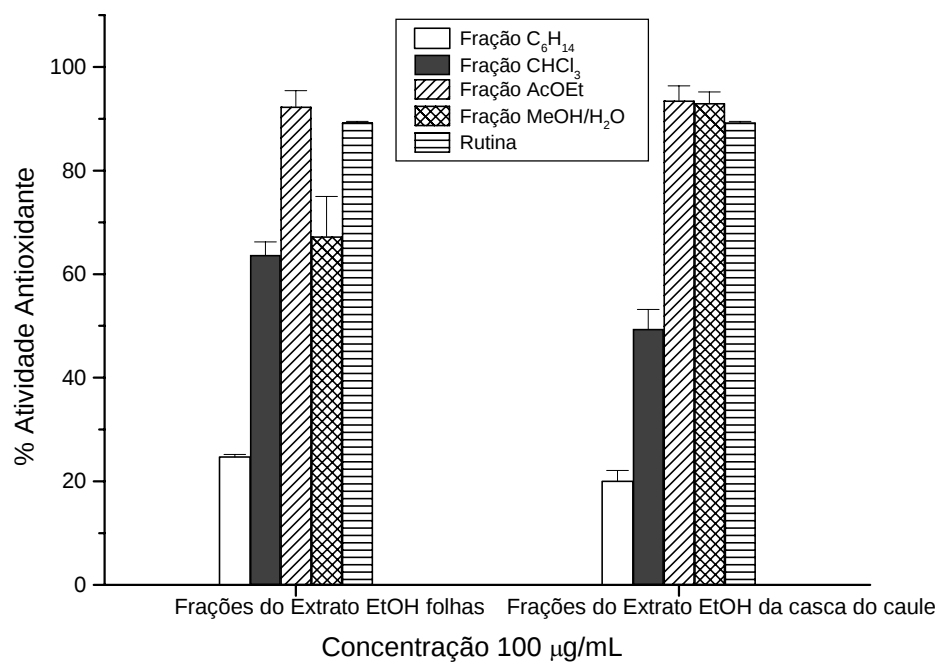


Figura 3. Atividade antioxidante das frações da partição líquido-líquido das folhas e casca do caule da *X. americana*.

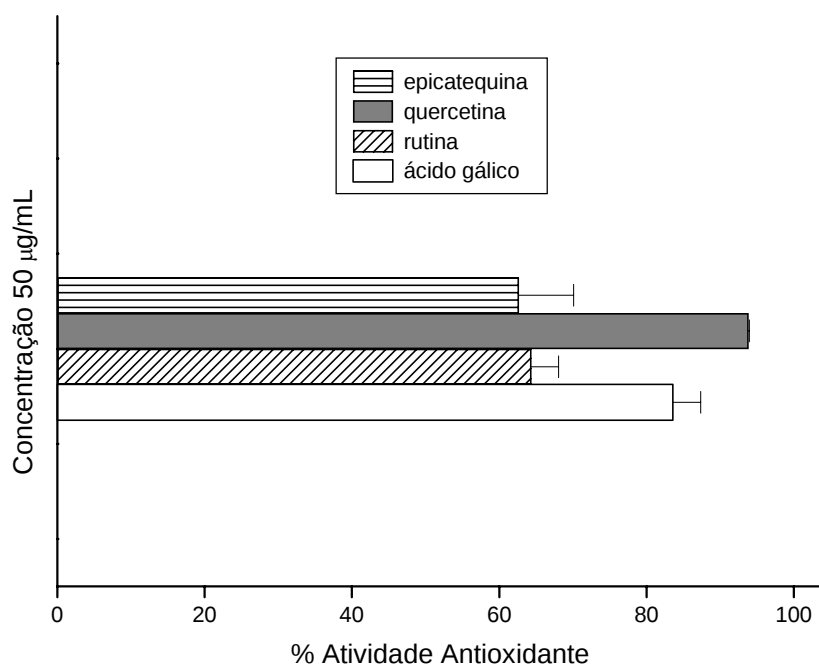


Figura 4. Atividade antioxidante dos compostos isolados da *X. americana* e controles na concentração de 50 µg/mL

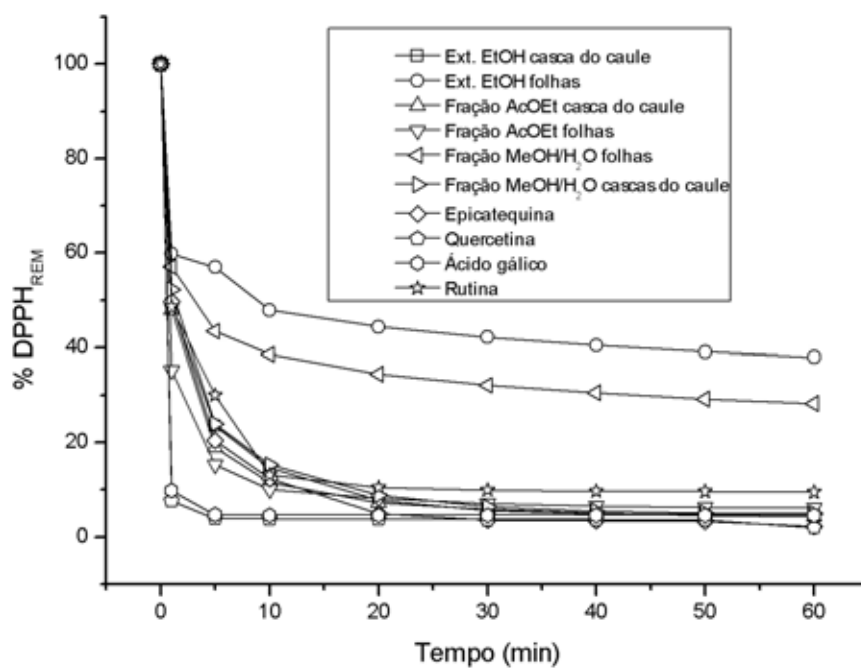


Figura 5. % DPPH_{rem} das amostras na concentração de 100 µg/ml.

TABELA 1. Conteúdo de fenóis totais (FT) e atividade antioxidante (CE₅₀) dos extratos EtOH e frações da *Ximenia americana*

Amostras	CE50 ± DP (µg/mL)	FT (mg de EAG/g de extrato EtOH ± DP)
Ext. EtOH da casca do caule	32,68 ± 0.18	678,66 ± 2.31
Ext. EtOH da madeira do caule	101,72 ± 10.33	447,47 ± 4,87
Ext. EtOH da folhas	68,30 ± 5.10	665,37 ± 2,50
Fração C ₆ H ₁₄ (folhas)	272,31 ± 9.67	153,29 ± 9,23
Fração CHCl ₃ (folhas)	60,31 ± 2.31	449,76 ± 7,90
Fração AcOEt (folhas)	33,03 ± 2.66	662,24 ± 3,08
Fração MeOH/H ₂ O (folhas)	53,84 ± 3.53	625,37 ± 8,01
Fração C ₆ H ₁₄ (casca do caule)	NA	90,25 ± 2,38
Fração CHCl ₃ (casca do caule)	84,24 ± 3.00	243,51 ± 3.00
Fração AcOEt (casca do caule)	29,62 ± 2.91	878,47 ± 0,75
Fração MeOH/H ₂ O (casca do caule)	33,65 ± 5.07	736, 84 ± 1.50
Composto – epicatequina (casca do caule)	34,64 ± 3.00	NT
Composto – quercetina (folhas)	16,40 ± 1.30	NT
NA – Não ativo; NT – Não testado		

CAPÍTULO 6

Antinociceptive and anti-inflammatory avaluation of extract, fractions and a catechin isolated from stem bark of *Ximenia americana* L. (Olacaceae)

(Artigo a ser submetido à Journal of Ethnofarmacogy)

Original research article

Antinociceptive and anti-inflammatory evaluation of extract, fractions and a catechin isolated from stem bark of *Ximenia americana* L. (Olacaceae)

Thays de Lima Matos Freire Dias¹; Valdiléia Teixeira Uchôa²; Aline Cavalcanti de Queiroz¹; Gabriela Muniz de Albuquerque Melo¹; Yolanda Karla Cupertino da Silva¹; Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana^{2*}; Magna Suzana Alexandre-Moreira¹

¹LaFI - Laboratório de Farmacologia e Imunidade, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, AL, Brazil

²Laboratório de Pesquisa em Recursos Naturais, Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Alagoas, Brazil

***Corresponding author:**

Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana, Universidade Federal de Alagoas - Instituto de Química e Biotecnologia – Cidade Universitaria 57.072-970 Maceió AL. Brazil aegs@qui.ufal.br Phone: +55-82-3214-1388; fax: +55-82-3214-1503. aegs@qui.ufal.br, antonio.euzebio@pq.cnpq.br

Abstract

The antinociceptive and anti-inflammatory action of stem bark ethanolic extract, fractions and a catechin isolated from *Ximenia americana* L were evaluated. The ethanolic extract, fractions and catechin – Xm-catechin administered by the i.p. route, were tested in several models: acetic acid-induced writhing, formalin, hot plate test and zymosan-induced peritonitis tests. The writhing assay revealed inhibitory effects. The formalin test in mice revealed an antinociceptive effect in both early (64.23 %) and late phases (86.80 %) by Xm-catechin (100 μ mol/Kg), while the chloroform fraction showed a weaker antinociceptive effect (31.51%) in the early phase. Indomethacin, aqueous fraction and ethanolic extracts caused significant inhibition of the late phase. Treatment of mice with Xm-catechin (100 μ mol/Kg, i.p.) or acetate fraction (from which Xm-catechin was isolated), had no central antinociceptive effect in the hot plate test, while morphine (15 μ mol/Kg, i.p.) significantly increased the reaction time in the hot plate test. The anti-inflammatory effects were determined based on zymosan-induced peritoneal inflammation, and the data indicate that Xm-catechin, aqueous fraction, ethanolic extract, ethyl acetate fraction and indomethacin reduced the cell number when compared with exudates from the vehicle-treated control group. These results demonstrate, for the first time, that extracts, fraction and Xm-catechin produce marked antinociception against acetic acid-induced visceral pain and inflammatory pain responses induced by formalin in mice or zymosan-induced cell migration. The antinociceptive action demonstrated in the present study lends at least partial support for the ethnomedical uses of this plant.

Keywords: Antinociceptive activity, Anti-inflammatory effect, Hot plate test, Writhing test, *Ximenia americana*.

1. Introduction

The drugs currently in use to manage pain are either narcotics or non-narcotics and for inflammatory conditions steroidal and non-steroidal compound are used. All these drugs present well known toxic side effects. In contrast, many medicines of plant origin have long been used with no adverse effects. It is therefore essential that efforts be made to introduce new medicinal plants to develop cheaper drugs (Calixto, 2005). Plants represent a still largely untapped source of structurally novel compounds that may serve for the development of novel drugs (Contreras et al., 2003).

Ximenia americana L., which belongs to the family Oleaceae, is a thorny bush very common in Piauí state (Brazil) and also found in tropical regions of America and Africa (Braga, 1960). In Brazil, it is known popularly as “ameixa-da-baia”, “ameixa-da-terra”, “ameixa-de-espinho”, and “sândalo-do-brasil” (Omer and Elnima, 2003). In northeastern Brazil it is used in folk medicine to treat several disorders, including inflammations, fever, diarrhea, and as a fertility regulating agent (Braga, 1960; Omer and Elnima, 2003). This plant is also active against rheumatism and many infections (Omer and Elnima, 2003). Several studies have demonstrated its pharmacological activity, e.g., antimicrobial (Ogunleye and Ibitoye, 2003), antitumor (Voss et al., 2006) and pesticidal properties (Fatope et al., 2000). Therefore, the purpose of this study was to evaluate evidence of the ethnobotanical properties of *X. americana* L. by means of *in vivo* experiments of the anti-inflammatory and antinociceptive activity of its extract, fractions, and isolated compound.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

Ximenia americana L. stem was collected in April 2002 in the city of Campo Maior, state of Piauí and identified by Dr. Maria Edilene Alencar. A voucher specimen under reference number 14407 was deposited at the Graziela Barroso Herbarium of the Federal University of Piauí (Teresina, PI, Brazil).

2.2. Extraction and Isolation

Stem bark (3.3 kg) of *X. americana* was dried at room temperature, then ground to a coarse powder (mesh size 2.5 mm) in a laboratory mill. The powdered bark (3.3 kg) was extracted with 3 x 8 L of 95% ethanol in a percolator for 3 days at room temperature ($26\pm 1^{\circ}\text{C}$). The extracts were concentrated under reduced pressure in a rotary evaporator, yielding 620g (18%) of a dry crude extract. A fraction of the ethanolic extract (500g) was suspended in methanol:water (4:6) and extracted successively with 2 L each of *n*-hexane, chloroform and ethyl acetate, yielding, respectively, hexane (10.75g), chloroform (7.20g), ethyl acetate (220g) and hydromethanol (240g) fractions.

The ethyl acetate residue (200,0 g) was subjected to filtration over deactivated silica gel (800 g) eluted stepwise with 1000 mL of each solvent: ethyl acetate (1) F3.1 (46.54g), ethyl acetate (2) F3-2 (29.11g) and methanol F3.3 (76.66g). The ethyl acetate fraction (F3.1) (40,0g) was subjected to CC over silica gel (100 g) eluted stepwise with a volume of 500 mL of each chloroform, methanol, and mixed chloroform and methanol as eluants. The $\text{CHCl}_3\text{:MeOH}$ (20%) fraction, a wine-colored amorphous solid (2,8g) was treated with ethyl acetate and ethyl ether and was stored in a freezer for 24 h and then filtered through a Büchner funnel yielding a beige

colored product dubbed XA1(2,2g). An analysis of NMR H^1 and NMR C^{13} spectra allowed for the identification of flavonoids of the catechin class known as epicatechins (Fig. 1).

2.3. Pharmacological procedures

2.3.1. Animals

Experiments were conducted using adult 6 to 8-week-old male and female Swiss mice weighing 20-30g each, supplied by the BIOCEN – UFAL breeding unit. The mice, which were divided into groups of 8 to 10 individuals, were fed and watered *ad libitum* and kept at 25–28°C under a controlled 12-hour light/dark cycle. The experiments in this study were granted prior approval (Number: 006443/2005-78) from the Federal University of Alagoas Animal Welfare Committee and were performed according to current guidelines for laboratory animal care and ethical guidelines for the investigation of experimental pain in conscious animals (Zimmerman, 1983).

2.3.2. Agents

The chemicals employed were acetic acid and indomethacin (Merck), dypirone (Sigma Chemical), morphine sulfate (Dimorf-Cristalia, Brazil), and Tween 20 (Sigma). A solution of 2.5% formalin was prepared with formaldehyde (Merck) in saline (0.9% NaCl). The ethanolic extract, aqueous fraction, hexane fraction, chloroform fraction, acetate fraction and Xm-catechin were used as suspensions in Tween 20 (0.05%) and distilled water (vehicle) in all experiments.

2.3.3. Acetic acid-induced writhing in mice (Koster et al., 1959)

At the beginning of the experiment, the mice were administered ethanolic extract and aqueous, hexane, chloroform and ethyl acetate (all in doses of 100 mg/Kg i.p.). The Xm-catechin isolated from *X. Americana* and dypirone were administered in doses of 300, 100, 30, 10 and 1

$\mu\text{mol/kg}$, i.p. Least-squares linear regression analysis of the log dose-response curves allowed for the calculation of the dose that produced 50% of antinociception (ID_{50}) by the Xm-catechin and reference drug, which were injected 40 min before the intraperitoneal injection (i.p.) of acetic acid 0.6% (10 ml/Kg body wt.). The control animals received only vehicle and acetic acid. Dypirone (10 mg/Kg body wt.) was used as a standard drug. Five minutes after administration of acetic acid, the number of writhes was recorded over a period of twenty minutes.

2.3.4. Formalin test in mice (Tjolsen et al., 1992)

The mice were pre-treated with catechin isolated from *X. americana* (Xm-catechin, 100 $\mu\text{mol/Kg}$, i.p.), ethanolic extract and fractions from *X. americana* (all in doses of 100 mg/Kg, i.p.) and Indomethacin (100 $\mu\text{mol/Kg}$, i.p.) as the standard drug. Then 40 minutes later the animals received 20 μl of a 2.5% formalin solution (0.92% formaldehyde, in saline) in the ventral surface of the right hind paw (i.pl.). They were then observed from 0 to 5 min (neurogenic phase) and from 15 to 30 min (inflammatory phase), and the time they spent licking the injected paw was recorded and considered as indicative of nociception.

2.3.5. Hot plate test in mice (Eddy and Leimbach, 1953)

The animals were placed on a hot plate (55 ± 1 °C). The reaction time (paw licking, jumping, shaking) was measured 30, 60, 90 and 120 minutes after intraperitoneal administration of the ethyl acetate fraction (100 mg/Kg, i.p.) and catechin (100 $\mu\text{mol/Kg}$, i.p.) isolated from *X. americana* L. The vehicle and morphine (15 $\mu\text{mol/Kg}$, i.p.) were used as control and standard drug.

2.3.6. Zymosan-induced peritonitis in mice

For this series of experiments, the method described by Doherty et al. (1985) and Kolaczowska et al. (2001) was used. Zymosan A (Sigma Aldrich) was freshly prepared (2 mg/mL) in sterile 0.9% w/v saline, and 0.5 mL was injected i.p. The animals were then killed by cervical dislocation. The peritoneal cavity was washed with 1.5 mL cold PBS, and after 6h of gentle manual massage, the exudate was retrieved and its volume was measured. The exudate was collected and used freshly for cell counts and cytospin preparations. The ethanolic extract and fractions (100 mg/Kg, i.p.), Xm-catechin (100 μ mol/Kg, i.p.), vehicle (control, i.p.) and indomethacin (100 μ mol/Kg, i.p.) were administered 30 min before the zymosan A injection.

2.4. Statistical analysis

The percentages of inhibition are reported as the mean $\pm$ S.E.M of inhibitions obtained in each individual experiment at the peak of the nociceptive or inflammatory response, depending on the experimental protocol. The data were compared statistically by analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's test. P values [$*P < 0.05$; $**P < 0.01$; $***P < 0.001$] were considered significant. When appropriate, the mean ID₅₀ values accompanied by their respective 95% confidence limits were determined by linear regression from individual experiments, using linear regression software, GrafPad Prism®.

3. Results

3.1. Acetic acid-induced writhing in mice

A dose-response curve of the Xm-catechin was also performed utilizing the writhing test in mice. In acetic acid-induced writhing (Table 1) the aqueous fraction (95.50%), ethanolic extract (98.20%), hexane fraction (92.34%), chloroform fraction (99.55%), ethyl acetate fraction (95.05%) (all at the dose of 100 mg/Kg, i.p.), and Xm-catechin (98.50%) (at the dose of 100

$\mu\text{mol/Kg}$) showed an inhibitory effect of nociceptive activity after intraperitoneal administration. Dypirone (85.60%) was also found to exert a significant protective effect (Table 1).

Still utilizing the writhing test in mice was performed a dose-response curve of the Xm-catechin. The results depicted in Figure 2 and Table 2 show that Xm-catechin (ID_{50} = 32.03 $\mu\text{mol/Kg}$, maximum effect= 83.50%) produced the same order of potency as that observed in the antinociceptive activity of dypirone (ID_{50} = 29.27 $\mu\text{mol/Kg}$, maximum effect= 99.60%).

3.2. Formalin test

The formalin test in mice revealed an antinociceptive effect (Table 3). The Xm-catechin (100 $\mu\text{mol/Kg}$, i.p.) caused a significant reduction in nociceptive responses during both phase I (64.23 %) and phase II (86.80 %). The chloroform fraction (100 mg/Kg, i.p.) induced reduction (31.51%) in the neurogenic phase (early phase), but not in the late phase (inflammatory phase). Indomethacin (100 $\mu\text{mol/Kg}$, i.p.), aqueous fraction and ethanolic extract (all in doses of 100 mg/Kg, i.p.) caused significant inhibition (49.86%, 73.68% and 82.40%, respectively) of the late phase, but this effect was not observed in the neurogenic phase (early phase).

3.3. Hot plate test

The hot plate test was used to determine whether Xm-catechin or ethyl acetate fraction had any central analgesic effect, but they showed no significant activity (Table 4). Morphine was used as a positive control in the hot plate test.

3.4. Zymosan-induced peritoneal inflammation

To determine the effects of Xm-catechin, aqueous fraction, ethanolic extract and ethyl acetate fraction on zymosan-induced peritoneal inflammation, and considering the anti-inflammatory activity observed in the late phase in the formalin test, the mice were treated with

test samples. Peritoneal exudates were harvested at 6h to determine the effects of the substance on cell migration. The number of leukocytes in peritoneal exudates from mice treated with Xm-catechin, aqueous fraction, ethanolic extract and ethyl acetate fraction decreased by 34.65%, 25.12%, 41.02%, and 38.17%, respectively, when compared to exudates from the vehicle-treated control, **Figure 3**. The inhibition in response to indomethacin was 52.55%.

4. Discussion

There is compelling evidence that many plants or their active principles used in traditional medicine may be useful for the treatment of pain or inflammatory conditions (for review see Calixto et al., 2003; Calixto et al., 2004). This work shows, for the first time, that extracts, fraction or and Xm-catechin from *X. americana*, administered intraperitoneally in mice, produce significant antinociceptive and anti-inflammatory action against chemical models of nociception (acetic acid-induced visceral pain or formalin-induced nociception) or the zymosan-induced model of peritoneal inflammation.

It has been suggested that acetic acid acts by releasing endogenous mediators that stimulate the nociceptive neurons which are sensitive to nonsteroidal anti-inflammatory (NSAIDs) and to opioids (Collier et al., 1968), and it is possible to quantify prostaglandins by radioimmunoassay in the peritoneal exudates of rats collected after intraperitoneal injection of acetic acid (Deraedt et al., 1980). These researchers found high levels of PGE2 and PGF2 prostaglandins in the first 30 min after acetic acid injection. Nevertheless, it was found that the intraperitoneal administration of acetic acid induces the release not only of prostaglandins but also of mediators of the sympathetic nervous system (Duarte et al., 1988). Therefore, our results show that the ethanolic extract, all the fractions and Xm-catechin induce peripheral antinociceptive effects. These findings are indicative of *X. americana*'s potential use as an antinociceptive agent.

Previous results have shown that formalin assays involve the release of various inflammatory mediators (Hunskar and Hole, 1987). However, indomethacin (a nonsteroidal anti-inflammatory drug) is ineffective against the early phase of formalin-induced pain. It is well known that NSAIDs (e.g., aspirin, acetaminophen and diclofenac), which are known to inhibit cyclooxygenase (COX) activity, are largely ineffective or cause very weak inhibition against the early phase in the formalin test (Malmberg and Yaksh, 1992). Our results, however, show that Xm-catechin administered by the intraperitoneal route induced a significant reduction in nociceptive responses during both neurogenic phase (64.23%) and inflammatory phase (86.80%), while indomethacin, the aqueous fraction, and ethanolic extracts caused significant inhibition of the inflammatory phase, and the chloroform fraction induced reduction in neurogenic phase, though not in the neurogenic phase, of the formalin test in mice.

The thermal stimulus of the hot plate test is employed to evaluate antinociceptive activity by the central mechanism (Eddy and Leimbach, 1953). In this model, the Xm-catechin and ethyl acetate fraction did not significantly increase the latency time. These results allow us to infer that the Xm-catechin and acetate fraction do not possess central antinociceptive effects. Morphine produced a marked and significant antinociception in the hot plate assay. Although the hot plate test is commonly used to assess narcotic analgesics, other centrally acting drugs, including sedatives and muscle relaxants or psychotomimetics have shown activity in this test (Eddy and Leimbach, 1953). However, unlike the effect of morphine, indomethacin and other NSAIDs have no effect in the hot plate test (Santos et al., 1998; Yamamoto and Nozaki-Taguchi, 1996).

Another interesting result of the current study was the fact that Xm-catechin, ethanolic extract and acetate fraction inhibit cell migration in zymosan-induced peritonitis, confirming their anti-inflammatory activity. Zymosan A is an insoluble polysaccharide component of the cell wall of *Sacharomyces cerevisiae* yeast. Among other actions, zymosan induces mast cell degranulation and activates macrophages. When administered in the peritoneal cavity of mice, zymosan induces

increased vascular extravasation, one of the primary signs of inflammation. This is a key step in the formation of inflammatory exudate and is followed by a time-dependent recruitment of migratory cells, especially neutrophils (Doherty et al., 1985). There are many mediators that coordinate the initial events of acute inflammation, such as vasoactive amines, lipid-derived eicosanoids, chemokines, reactive oxygen species (ROS), NO, and cytokines. Edema is a result of plasma protein extravasation induced by vasoactive amines and eicosanoids (Lawrence et al., 2002; Sherwood and Toliver-Kinsky, 2004).

These data suggest that, like indomethacin, the Xm-catechin, aqueous fraction, and ethanolic extracts can also produce antinociceptive action through COX inhibition, and consequently, prostaglandin synthesis. However, the possibility that Xm-catechin, aqueous fraction, and ethanolic extracts act on COX remains to be tested in future studies. Also, it is reasonable to assume that the Xm-catechin and chloroform fraction may act in other ways, considering the action evidenced in the first phase in the formalin test.

Unpublished findings of our group also demonstrate that the treatment of mice with *X. americana* extracts, fraction or Xm-catechin produces no changes in behavior, such as the appearance of involuntary movements, piloerection, stimulatory or sedative effects, respiratory depression or gastric toxic effects.

5. Conclusions

This study has shown that the fractions, extracts and catechin isolated from *X. americana* possess significant antinociceptive effects in laboratory animals at the doses investigated. Our results support the traditional use of this plant for some painful and inflammatory conditions, and its activity is attributed to the flavonoid (Xm-catechin) reported here which is present in the ethyl acetate fraction of the plant's stem bark extract. Furthermore, the antinociceptive action supports, at least partially, the ethnomedical uses of this plant.

Acknowledgements

The authors thank CNPq, FAPEAL, CAPES and IM-INOVAR (Project #420015/05-1) for their financial support and fellowships.

References

Braga, R., 1960. Plantas do Nordeste Especialmente do Ceará, fourth ed. Editora Universitária, Natal.

Calixto, J.B., 2005. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin American Journal of Ethnopharmacology. 100, 131–134.

Calixto, J.B., Otuki, M.F., Santos, A.R., 2003. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part I. Action on arachidonic acid pathway, nitric oxide and nuclear factor kappa B (NF-kappaB). *Planta Medica*. 69, 973–983.

Calixto, J.B., Campos, M.M., Otuki, M.F., Santos, A.R., 2004. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. Modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. *Planta Medica*. 70, 93–103.

Collier, H.O.J., Dinneen, J.C., Johnson, C.A., Schneider, C., 1968. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. *British Journal of Pharmacology and Chemotherapy*. 32, 295–310.

Contreras, J.M., Bourguignon, J.J., 2003. *The Practice of Medicinal Chemistry*, second ed. New York Academic Press, New York.

Deraedt, R., Jouquey, S., Delevallee, F., Flahaut, M., 1980. Release of prostaglandins E and F in an algogenic reaction and its inhibition. *European Journal of Pharmacology*. 61, 17–24.

Doherty, N.X., Poubelle, P., Borgeat, P., Beave, T.H., Westrich, G.L, Schrader, N.L., 1985. Intraperitoneal injection of zymosan in mice induces pain, inflammation and the synthesis of peptidoleukotrienes and prostaglandin E2. *Prostaglandins*. 30, 769–789.

Duarte, J.D.G., Nakamura, M., Ferreira, S.H., 1988. Participation of the sympathetic system in acetic acid induced writhing in mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 21, 341–343.

Eddy, N.B., Leimbach, D., 1953. Synthetic analgesics. II. Dithienylbutenyland dithienylbutylamines. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 107, 385–393.

Fatope, M.O., Adoum, O.A., Takeda, Y., 2000. C18 Acetylenic Fatty Acids of *Ximenia americana* with Potential Pesticidal Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48, 1872-1874.

Hunskar, S., Hole, K., 1987. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain*. 30, 103–114.

Kolaczowska, E., Seljelid, R., Plytycz, B., 2001. Role of mast cells in zymosan-induced peritoneal inflammation in Balb/c and mast cell-deficient WBB6F1 mice. *Journal of Leukocyte Biology*. 69, 33–42.

Koster, R., Anderson, M., De Beer, E.J., 1959. Acetic acid for analgesic screening. Federation Proceeding. 18, 418-420.

Lawrence, T., Willoughby, D.A., Gilroy, D.W., 2002. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. Nature Review Immunology. 2, 787–795.

Malmberg, A.B., Yaksh, T.L., 1992. Antinociceptive actions of spinal nonsteroidal anti-inflammatory agents on the formalin test in the rat. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 263, 136–146.

Omer, M.E.F.A., Elnima, E.I., 2003. Antimicrobial Activity of *Ximenia americana*. Fitoterapia. 74, 122-126.

Ogunleye, D.S., Ibitoye, S.F., 2003. Studies of antimicrobial activity and chemical constituents of *Ximenia americana*. Tropical Journal of Pharmaceutical Research. 2, 239-241.

Santos, A.R.S., Vedana, E.M.A., Freitas, G.A.G., 1998. Antinociceptive effect of meloxicam, in neurogenic and inflammatory nociceptive models in mice. Inflammation Research. 47, 302–307.

Sherwood, E.R., Toliver-Kinsky, T., 2004. Mechanisms of the inflammatory response. Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology. 18, 385–405.

Tjolsen, A., Berge, O.G., Hunskaar, S., Rosland, J.N., Hole, K., 1992. The formalin test: an evaluation of the method. Pain. 51, 5-17.

Voss, C., Eyol, E., Frank, M., Von der Lieth, C.W., Berger, M.R., 2006. Identification and characterization of riproximin, a new type II ribosome-inactivating protein with antineoplastic activity from *Ximenia Americana*. The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal. 20, 334-345.

Zimmerman, M., 1983. Ethical guidelines for investigation of experimental pain in conscious animals. Pain . 16, 109-110.

Yamamoto, T., Nozaki-Taguchi, N., 1996. Analysis of the effects of cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 in spinal nociceptive transmission using indomethacin, a non-selective COX inhibitor, and NS-398, a COX-2 selective inhibitor. Brain Research. 739, 104–110.

Figure Legends

Fig. 1. Chemical structures of epicatechin (**1**), a compound isolated from *X. americana*.

Fig. 2. Dose-response curves of Xm-catechin (▲) and dypirone (■) (all in doses of 1, 10, 30, 100 and 300 µmol/Kg, i.p.) on the 0.6% acetic acid-induced abdominal constrictions observed for 20 min five minutes after the administration of acetic acid.. Data are expressed as the inhibition percentage of total writhings calculated from eight animals. ** $P < 0.01$ (ANOVA followed by Dunnett's test).

Fig. 3. Effect of indomethacin and Xm-catechin (both 100 µmol/Kg, i.p.), ethanolic extract and ethyl acetate fraction (both 100 mg/Kg, i.p.), on cell migration. Mice were killed at the time-point of 6 h after zymosan-induced peritonitis. Total cell migration was counted using a Neubauer chamber. Data represent mean±S.E.M. from at least six animals.* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

Fig. 1.

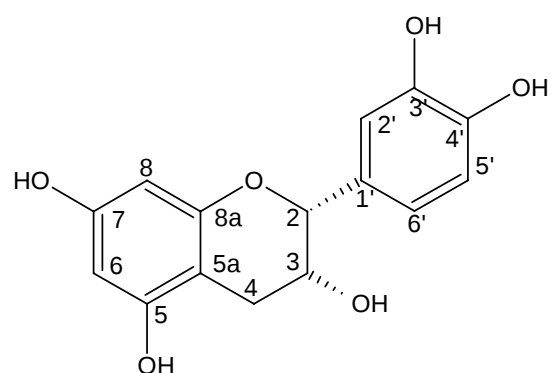


Fig. 2.

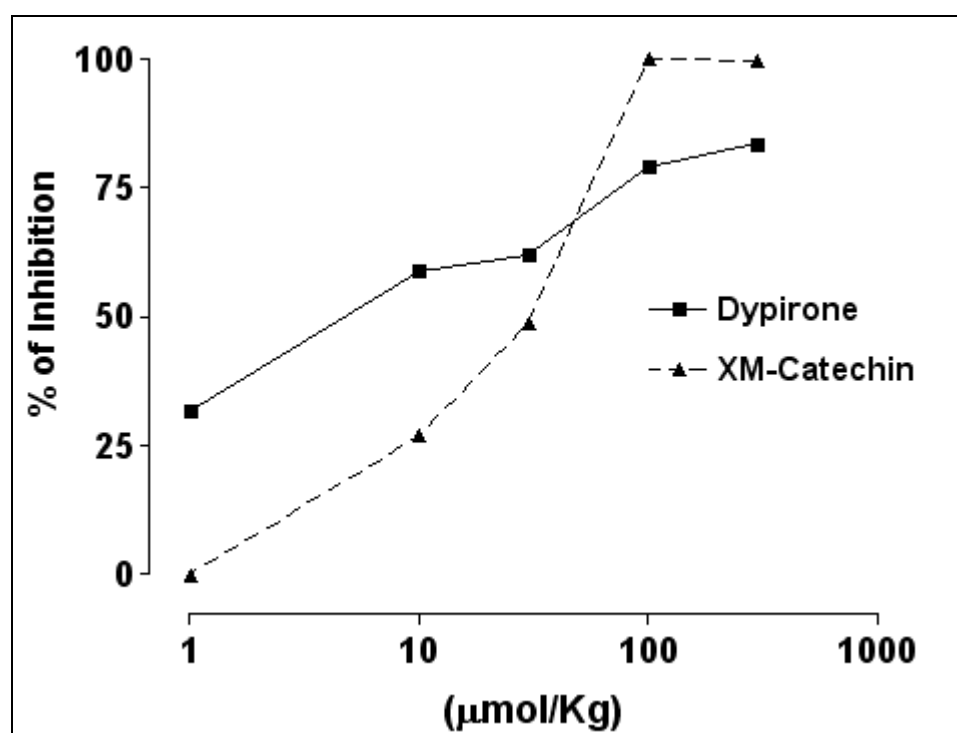


Fig. 3.

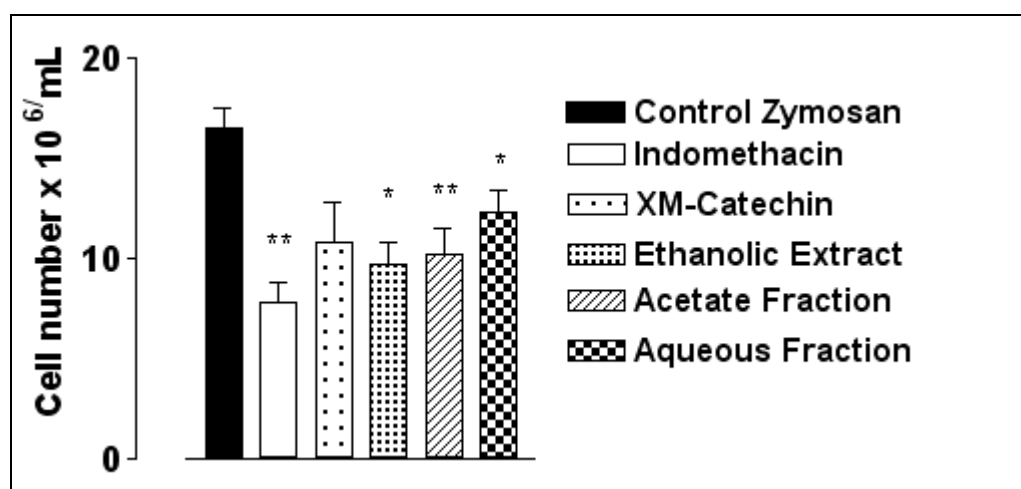


Table 1. Antinociceptive effect of the extract, fractions and catechin isolated from *X. americana* on acetic-induced abdominal writhing in mice.

Group	Dose	n ^a	Number of abdominal ^b constrictions $\pm$ S.E.M.	Inhibition (%)
	(mg/kg) or $\square$ mol/Kg#			
Control (vehicle)	---	8	44.40 $\pm$ 1.86	---
Dypirone [#]	100	8	6.50 $\pm$ 0.50**	85.60
Ethanollic Extract	100	8	0.80 $\pm$ 0.58**	98.20
Aqueous Fraction	100	8	2.00 $\pm$ 2.00**	95.50
Hexane Fraction	100	8	3.40 $\pm$ 0.98**	92.34
Chloroform	100	8	0.20 $\pm$ 0.20**	99.55
Acetate fraction	100	8	2.20 $\pm$ 1,36**	95.05
Xm-catechin [#]	100	8	0.67 $\pm$ 0.67**	98.50

^aNumber of animals; ^b Values are expressed as mean $\pm$ S.E.M, ^c not statistically significant;

**p<0.01 (One-way ANOVA followed by Dunnett's test).

Table 2. Power and efficacy of dypirone and Xm-catechin in acetic acid-induced writhing in mice.

Substances	Inhibitory Dose (ID) ₅₀	Maximum Effect
Dypirone	29.27 μ mol/kg	83.50 %*
Xm-catechin	32.03 μ mol/kg	99.60%*

Number of animals (7-8); *p<0.05 (One-way ANOVA followed by Dunnett's test).

Table 3. Anti-inflammatory profile of Xm-catechin, ethanolic extract and fractions of *X. americana* in the formalin test.

Group	Dose (mg/kg) or □mol/Kg#	n ^a	1 st phase neurogenic ^b Time (s)	1 st phase Inhibition (%)	2 nd phase inflammatory ^b Time (s)	2 nd phase Inhibition (%)
Control (vehicle)	---	10	65.70 ± 2.48	---	207.40 ± 24.67	---
Indomethacin [#]	100	8	51.20 ± 4.78	21.32	104.00 ± 1.38**	49.86
Xm-catechin [#]	100	8	23.50 ± 7.05**	64.23	27.38 ± 12.77**	86.80
Ethanolic Extract	100	10	51.60 ± 5.20	21.46	36.50 ± 14.68**	82.40
Acetate Fraction	100	8	60.43 ± 5.52	8.02	181.70 ± 24.88	12.40
Hexane Fraction	100	8	61.33 ± 2.65	6.65	169.30 ± 12.68	18.37
Chloroform Fraction	100	8	45.00 ± 2.86*	31.51	203.20 ± 23.43	2.03
Aqueous Fraction	100	8	62.00 ± 8.49	5.63	54.60 ± 27.10**	73.68

^aNumber of animals; ^b Values are expressed as mean ± S.E.M, **p<0.01, *p<0,05

(One-way ANOVA followed by Dunnett's test).

Table 4 – Effects of ethyl acetate fraction and Xm-catechin of *X. americana* on mice in the hot plate test.

Group		Mean latency in hot plate test (s)			
	Pre-treatment (min)	Post-treatment			
		30 min	60 min	90 min	120 min
Control	2.75 ± 0.46	2.50 ± 0.44	2.03 ± 0.37	4.24 ± 0.71	3.28 ± 0.78
Morphine	1.89 ± 0.55	9.03 ±	7.40 ±	5.39±	2.58 ±0.23
		1.64*	0.89*	0.85*	
Acetate Fraction	5.87 ± 0.89	4.35 ± 0.39	4.89 ± 1.28	6.63 ± 1.84	5.56 ± 0.92
Xm-catechin	4.32 ± 0.94	3.25 ± 0.48	4.59 ± 0.66	5.17 ± 0.92	5.64 ± 1.3

Data represented as mean ± S.E.M, (%) – Percent inhibition of total hot plate response, number of animals = 8, * p < 0.05 (One-way ANOVA).

CAPÍTULO 7

Constituintes químicos da *Cecropia pachystachya* Tréc.

(Artigo a ser submetido à *Phytochemistry Letter*)

Constituintes químicos das raízes e caule da *Cecropia pachystachya* Tréc.

Valdiléia T. Uchôa¹ e Antônio Euzébio G. Sant'Ana^{*1}

Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, 57072-970 Maceió - Al

Correspondente autor. Tel.: 55-82-3214-1388

Fax.: 55-82-3214-1384

E-mail address: aegs@qui.ufal.br

RESUMO

Seis triterpenos e dois esteróides foram isolados das raízes e do caule de *Cecropia pachystachya* (Cecropiaceae) coletada no nordeste brasileiro. Dentre estes os compostos 28-norursa-12-17-19-21-tetraeno-2 α ,3 β -diol descrito pela segunda vez na literatura e 2 α ,3 α -di-O-acetiloleano-12-en-28-ato de metila, descrito aqui pela primeira vez como um produto isolado de planta. Os compostos foram identificados por análise espectroscópica.

ABSTRACT

Six triterpenes and two steroids were isolated from the roots of *Cecropia pachystachya* (Cecropiaceae) collected in northeast of Brazil. The compounds 28-norursa-12-17-19-21-tetraen-2 α ,3 β -diol and methyl 2 α ,3 α -di-O-acetilolean-12-en-28-ate were described for the first time as natural products. The compounds were identified by spectroscopic analysis.

1. Introdução

A espécie *Cecropia pachystachya* Tréc. (syn.: *Cecropia adenopus* Mart.), da família Cecropiaceae (Lobova, et al., 2003) é uma árvore ereta, de 5-15 metros de altura, com troncos vazios e segmentados, onde as formigas (*Azteca*) vivem em metabiose (Andrade & Carauta, 1979). Ela é comum em todo território brasileiro (Carauta, 1996) sendo conhecida popularmente como “embaúba” (Braga, 1960; De Moraes et al., 2005) e é usada pela população nativa no

tratamento de bronquite, asma, pressão alta, como cardiotônico, no tratamento da febre e como diurético (Di Stasi, 1996, Soraru & Bandoni, 1978). As folhas apresentaram atividade broncodilatadora e efeito cardiovascular (Consolini & Migliori, 2005) e ação cardiotônica e sedativa (Consolini et al., 2006), propriedade antioxidante (Velásquez et al., 2003) e atividade anti-inflamatória e apoptótica (Schinella, et al., 2008). Estudos fitoquímicos da planta revelaram a presença dos triterpenos, α -amirina, ácido ursólico, ácido oleanólico (Hikawczuk et al., 1998), ácido pomólico (Schinella, et al., 2008) e do esteróide β -sitosterol (Hikawczuk et al., 1998).

2. Resultados e discussão

Da fração em hexano das raízes da *C. pachystachya* foi isolado os composto β -sitosterol (**1**), sitostenona (**2**), 28-norursa-12-17-19-21-tetraen-2 α ,3 β -diol, também denominado beccaridiol (**3**) e ácido tormêntico (**4**).

O composto **1** (Fig. 01) apresentou-se como um cristal na forma de escama, de cor branca, pf. 134,2°C – 135,6° C (Etanol), o espectro na região do IV obtidos em solução de KBr, revelou bandas em $\nu_{\text{máx}}$ (cm⁻¹): 3426 (O-H), 2937 (C-H, CH₂ e CH₃) e 1663 (C=C). O espectro de RMN de ¹³C em CDCl₃, apresentou 29 sinais de carbono. Os sinais a δ 140,28 e δ 121,73, de carbonos olefínicos (C-5=C6-) de esteróides e o sinal a δ 71,83 a um carbono carbinólico (C-3), os outros sinais estão expressos na Tabela 01. A comparação dos dados de **1** com valores registrados na literatura (Nes et al., 1992), permitiu identificar essa substância como o **β -sitosterol**, um esteróide comumente encontrado como metabólito secundário em plantas.

O composto **2** (Fig. 01) apresentou-se como cristais em forma de agulha, de cor branca, pf 81,2 °C – 83,3 °C (Etanol). Seu espectro no IV, revelou bandas em $\nu_{\text{máx}}$ (cm⁻¹): 2953,2 e 2867,2 (C-H, CH₂ e CH₃), 1677 (C=O) e 1617,7 (C=C). O espectro de RMN de ¹³C em CDCl₃ indicou

29 átomos de carbono. O sinal simples a δ 5,75 (H-4) correlaciona-se com o carbono olefínico a 123,75 (C-4) e com o carbono da carbonila (cetona α,β -insaturada) em δ 199.68 (C=O). Estes dados permitiram propor a estrutura da **sitostenona** para esta substância.

O composto **3** (**Fig. 01**) é um sólido amorfo de cor branca e Pf. 131 – 133 °C (EtOH). Seu espectro no IV, revelou bandas em $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}): 3324 (O-H), 2950 (C-H, CH_2 e CH_3), 1047 (C-O) e 808 cm^{-1} atribuída a hidrogênio em posição orto em um anel aromático. O espectro de RMN de ^1H em CDCl_3 , possui dois dupletos a δ 6,96 (H-21) e 6,82 (H-22) ($J = 7,5 \text{ Hz}$) de hidrogênios aromáticos, evidenciando a relação orto entre ambos. O sinal a δ 5,54 (dd, $J = 4.5$ e 2.6 Hz) característico de hidrogênio olefínico, foi atribuído ao H-12. Os sinais em δ 3,77 (ddd) e δ 3.05 (d) referem-se a hidrogênios carbinólicos H-2 e H-3, respectivamente. Os sinais entre δ 0.90 – 1.10, referente a 5 grupos metilas e um sinal intenso a δ 2.30 atribui-se a dois grupos metilas em anel aromático. O espectro de RMN de ^{13}C (**Tabela 01**) e DEPT, mostram sinais para somente 29 carbonos que são distinguidos como 6 metilas, 6 metilênicos, 7 metínicos e 9 carbonos quaternários. Os sinais a δ 125.24 (CH) e 138.99 (quaternário) referem-se aos carbonos olefínicos (C-12 e C-13) existentes na molécula. Os sinais a δ 125,28 (CH) e 127,73 (CH) referem-se aos carbonos aromáticos metínicos C-21 e C-22 (δ 6,92 (d) e 6.96 (d)) respectivamente. Os demais quatro átomos de carbonos quaternários do anel são observados a δ 134,18; 135,50; 136,81 e 139,30. Os dados espectrais permitiram propor a estrutura de um nor-triterpeno ursano com o anel E aromático, relatado pela primeira vez na família Cecropiaceae. A comparação destes dados com os dados descritos na literatura ([Jang et al., 2006](#)) permitiu propor para o composto **3** a estrutura do **beccaridiol**.

O composto **4** (**Fig. 01**) é um sólido amorfo de cor branca, pf. 270,4 – 272 °C (Etanol), cujo espectro na região do IV, apresenta bandas em $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}): 3447 (O-H) e 1689 (C=O). O RMN ^1H em CD_3OD mostra sinal em δ 5,28 (t, $J = 3,8 \text{ Hz}$) de um hidrogênio olefínico (H-12). Em

δ 3,95 (ddd) e δ 3,45 (d) referem-se a hidrogênios carbinólicos (C-2 e C-3), respectivamente. O espectro de RMN ^{13}C em CD_3OD , possui trinta sinais cujo espectro DEPT permitiu classificá-los como: 8 quaternários, 7 metínicos, 8 metilênicos e 7 metilas. Observou-se o sinal de um grupo carbonila a δ 181,36 (C-28) e sinais a δ 138,08 (C-13) e a δ 128,35 (C-12) referentes a carbono olefínicos. Os sinais δ 79,11 e 66,17 foram atribuídos aos carbonos carbinólicos (C-3 e C-2). A comparação destes dados com os dados descritos na literatura (Taniguchi et al., 2002) permitiu propor para o composto **4** a estrutura do **ácido tormêntico**.

Da fração em hexano do caule da *C. pachystachya* foi isolado os compostos 2 α ,3 α -di-O-acetilolean-12-em-28-ato-de metila (**5**), lupeol (**6**), α e β -amirina (**7** e **8**). O composto **5** (22 mg) apresenta-se como um sólido amorfo, de cor branca, cujo espectro no IV, apresenta bandas em $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}): 3500 (O-H) e 1720 (C=O). O espectro de RMN ^1H ($\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$) apresentou vários simpletos na região de δ 0,8 a 1,25, correspondentes a hidrogênios de carbono metílicos. Este espectro revelou a presença de dois grupos $-\text{CH}_3$ referentes a grupos acetilas, a δ 2,12 e 2,08, referentes a AcO-2 e AcO-3, respectivamente, duplete em δ 4,89 ($J = 4,8$ Hz), corresponde a H-3 em posição equatorial. O sinal em δ 5,20 na forma de um tripleto duplo ($J = 10,5$ e 4,8 Hz) foi atribuído a H-2, o valor de $J = 10,5$ Hz observado neste sinal, confirma a interação axial-axial deste hidrogênio com o H-1. O conjunto de dados indica tratar-se de um triterpeno, com dois grupos hidroxilas acetilados, sugerindo a presença de um sistema 2 α ,3 α -di-O-acetil. O espectro RMN ^{13}C ($\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$), apresentou 35 sinais, cujo espectro DEPT, indicam tratar-se de dez grupos metilas (CH_3), nove carbonos metilênicos (CH_2), seis metínicos (CH) e dez carbonos não hidrogenados. O espectro de RMN ^{13}C revelou a presença de sinais de dois carbonos carbinólicos em δ 68,42 e 80,78, referentes aos C-2 e C-3, dos dois grupos acetilas em δ 171,38 e 171,03, respectivamente. Os sinais em δ 128,50 e 138,27, referem-se aos carbonos olefínicos C-12 e C-13, respectivamente. Os sinais de carbono em δ 21,05 e 20,97, referentes as metilas dos grupos

acetilas em C-2 e C-3 (Olea & Roque, 1990). O sinal em δ 53.14, refere-se a metoxila C-28 (MeO-28) (Lontsi, et al., 1998). Os dados indicaram tratar-se de triteperno pentacíclico do tipo oleanano. Uma evidência é o deslocamento do C-18, cujo valor de δ 41,04, pois segundo Mahato & Kundu 1994, o C-18 na série ursano apresenta-se a δ 53,0. A comparação destes dados com os dados descritos na literatura (Mahato & Kundu, 1994; Monte et al., 2001) permitiram propor para o composto 5 a estrutura do $2\alpha,3\alpha$ -di-O-acetilolean-12-em-28-ato-de metila sendo esta a primeira descrição de sua ocorrência natural embora já tenha sido descrito como produto obtido da acetilação e metilação da fração em hexano da *Mentha villosa* (Monte et al., 2001).

O composto 6 (20 mg) é um sólido branco de Pf. 176-178 °C (Etanol) cujo espectro no IV revelou bandas em $\nu_{\text{máx}}$ (cm-1): 3332 (O-H), 3069 (C-H de vinila), 2943 e 2871 (C-H, de CH₂ e CH₃) e 1649 (C=C de vinila). O RMN ¹H em CDCl₃, apresentou vários sinais em δ 0,8 a 1,0, referentes a hidrogênio de CH₃, CH₂ e CH, o sinal a δ 3.20 (dd, J=5 e 16Hz) de hidrogênio metínico carbinólico é característico em espectros de triterpenóides do tipo 3 β -OH. O sinal em δ 1.70 (1H, s, H-30) referente ao CH₃ ligado ao CH₂ em δ 4.71 e 4.59 (2H, d, J= 2,4 Hz, H-29a e 29b), o que indica a presença de uma ligação dupla *gem*-dissubstituída. O RMN ¹³C em CDCl₃, apresentou 30 sinais, definidos pelo DEPT, como sendo sete referentes a carbonos metílicos (CH₃), onze a carbonos metilênicos (CH₂), seis a metínicos (CH) e seis a carbonos não hidrogenados. O sinal em δ 79,2 sugere-se um carbono carbinólico (C-3), confirmando a estereoquímica 3 β -OH, pois na configuração 3 α -OH seria $76,1\pm0,5$ (Mahato & Kundu, 1994) e observa-se que C-24 apresenta-se protegido δ 15,5 confirmando que C-3 possui configuração beta Mahato & Kundu, 1994. Os sinais referentes à ligação dupla *gem*-dissubstituída (CH₂) δ 109.5 (C-29) e 151.2 (C-20) caracterizaram o esqueleto lup-20(29)-eno (Olea & Roque, 1990). A comparação dos dados observados com os descritos na literatura, permitiu identificar o composto como sendo o **triterpenóide lupeol** (Mahato & Kundu, 1994).

Os compostos 7 e 8 (100 mg), um sólido branco, p.f. 171-173⁰C, cujo espectro na região do IV revelou bandas em $\nu_{\text{máx}}$ (cm⁻¹): 3200 (O-H) e 2943 e 2871 (C-H, de CH₂ e CH₃). O RMN ¹H em CDCl₃, desta mistura apresentou sinais de hidrogênios (H-12) olefinicos (δ 5.14 e 5,20 (t), J=4.8 Hz), de hidrogênios carbinólicos (H-3) do tipo 3 β -OH (δ 3.40 (dd); J=10.0 e 6.0 Hz) e a feição dos sinais entre δ 1.10 e 0.77 para vários grupos metílicos. O RMN ¹³C em CDCl₃, apresentou de 30 sinais, definidos pelo DEPT 135^o, como sendo oito referentes a carbonos metílicos (CH₃), dez a carbonos metilênicos (CH₂), cinco a metínicos (CH) e sete a carbonos não hidrogenados. No espectro de RMN ¹³C em CDCl₃ apresentou, um carbono carbinólico (C-3; δ 79.26) e dois pares de carbonos olefinicos (C-12 e C-13), sendo mais intenso δ 145.10 (C) e 121.60 (CH) que caracteriza-se a β -amirina (esqueleto olean-12-eno) sinais em δ 140.00 (C) e 124.60 (CH), que caracteriza-se a α -amirina (esqueleto e urs-12-eno). A comparação dos dados de RMN com os dados descrito na literatura (De Carvalho et al., 1998), permitiu identificar como uma mistura de triterpeno pentacíclico, denominados α - e β -amirina.

3. Experimental

3.1. Procedimentos gerais

Os solventes utilizados foram destilados no laboratório de destilação do IQB-AL, a partir de solvente de grau comercial adquiridos da Empresa Moraes de Castro (Recife – PE) e os solventes de grau analítico e deuterados foram obtidos da Vetec e Merck (São Paulo). As placas de cromatografia em camada delgada (CCD) foram adquiridos da Merck. A revelação das cromatoplas foi realizada por exposição à irradiação de luz na região do ultravioleta, por imersão em cuba de iodo e borrifação com solução de sulfato cérico (Vetec) ou borrifação com solução alcoólica de anisaldeído a 30% seguido de aquecimento a 100°C por 10 minutos em estufa. Os espectros de RMN ¹H e ¹³C (1D e 2D) foram obtidos em espectrômetro Brüker modelo

Avance DRX-500 e DPX 300, operando respectivamente a 500 e 300 MHz (^1H), 125 e 75 MHz (^{13}C), utilizando CDCl_3 e CD_3OD como solventes e TMS como referência interna. Estes equipamentos pertencem ao Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear – CENAUREMN da Universidade Federal do Ceará e Universidade Federal de Alagoas

3.2. *Material Botânico*

As raízes e o caule da *Cecropia pachystachya*, foram coletados em Março/2002 no Município de Barra de São Miguel – Estado de Alagoas e a identificação botânica foi efetuada pela Dra. Rosângela Lemos. Uma exsicata encontra-se depositada no Herbário do IMA – Instituto do Meio Ambiente de Alagoas sob o número MAC 14.305.

3.3. *Preparação dos Extratos Etanólicos*

A planta foi dividida em duas partes: raízes (3,7 kg) e caule (7 kg). Posteriormente foram secas a 40°C em estufa sob ventilação e reduzidas a pó em uma máquina forrageira (Nogueira Itapira-SP, mech 2mm) e extraídas com etanol 90%, por 72 horas, em extrator de aço inoxidável, a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ por três vezes. Ao final deste tempo o solvente foi removido por destilação em aparelho rotatório a baixa pressão, fornecendo os respectivos extratos etanólicos da raiz (170 g; 4,6%) e do caule (200 g; 3,0%). A umidade residual foi removida em um dessecador usando-se sílica como agente dessecante.

3.4. *Fracionamento dos extratos etanólicos das raízes e do caule*

O extrato etanólico da raiz (160g) foi suspenso em 1500 mL de uma mistura $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (2:3). O precipitado foi removido por filtração em papel e a solução foi submetida a partição líquido-líquido com solventes de polaridade crescente, C_6H_{14} (5 x 400mL), CHCl_3 (5 x 400mL), AcOEt (5 x 400mL) que após remoção dos solventes forneceu as frações em C_6H_{14} (9,22g;

5,8%), CHCl_3 (0,91g; 0,57%), AcOEt (22,47g; 14,5%), $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (32,61g, 20%) e fração precipitado (91,15g, 57%). A fração em C_6H_{14} (8,22g; 5,42%) foi cromatografada em coluna de sílica (160g) fornecendo seis subfrações: MRP1.1 ($\text{C}_6\text{H}_{14}/\text{CHCl}_3$ 20%), MRP1.2 ($\text{C}_6\text{H}_{14}/\text{CHCl}_3$ 1:1), MRP1.3 ($\text{C}_6\text{H}_{14}/\text{CHCl}_3$ 80%), MRP1.4 (CHCl_3), MRP1.5 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 2,5%) e MRP1.6 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 5%). A subfração MRP1.2 (2,65g; 31%) oleosa, de cor amarelo-claro, solúvel em CHCl_3 , foi submetida a cromatografia em coluna com gel de sílica impregnada com KOH a 10%. Foram coletadas 100 frações de 10 ml, empregando-se na eluição das mesmas C_6H_{14} , CHCl_3 , MeOH e misturas destes. As frações 14-36 (1,50g) foram reunidas após análise por CCD usando como eluente $\text{C}_6\text{H}_{14}/\text{CHCl}_3$ 5% e levou ao isolamento do composto 1 (Fig. 01), (1,0 g, 38%), após cristalização em EtOH . Uma recristalização da água mãe em EtOH levou ao isolamento do composto 2 (Fig. 01) (50 mg, 1,88%). A subfração MRP1.5 (1,93g; 21%), um sólido gelatinoso, de cor verde-escuro, solúvel em CHCl_3 , foi submetida a cromatografia em coluna em gel de sílica. Foram coletados 60 frações de 10 mL cada, empregando-se na eluição das mesmas C_6H_{14} , CHCl_3 , MeOH e misturas destes. As frações 30-35 (50 mg) foram reunidas após análise CCD usando como eluente Hex/CHCl_3 1:1 e levou a obtenção do composto 3 (Fig. 01) (50 mg; 2,5%). A subfração MRP1.6 (3,92g; 42,52%) foi submetida a cromatografia em gel de Sephadex LH-20, utilizando o MeOH como solvente único, desta coluna foram coletadas 90 frações de 10 mL cada. As frações 50-60 (400mg; 10%) foram reunidas após análise de CCD usando como eluente $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 15% e submetida a recristalização em EtOH , fornecendo o composto 4 (Fig. 01) (100 mg; 25%).

O extrato EtOH do caule (180g) foi suspenso em 1,5 L de uma mistura $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (2:3). O precipitado foi removido por filtração em papel e a solução foi submetida a partição líquido-líquido com solventes de polaridade crescente, C_6H_{14} (5 x 400mL), CHCl_3 (5 x 400mL), AcOEt (5 x 400mL) que após remoção dos solventes forneceram as frações em C_6H_{14} (25,5 g; 14%), CHCl_3 (90,0 g; 50%), AcOEt (22,31 g; 12%), $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (35,0 g; 19%). A fração C_6H_{14} (20 g),

de cor verde-escuro, solubilizada em CHCl_3 , foi submetida a cromatografia de coluna de sílica gel, eluída com C_6H_{14} , CHCl_3 e MeOH, em diversas proporções. As amostras foram analisadas em CCD, totalizando 200 subfrações e as que apresentaram maior grau de pureza foram recromatografadas. A subfração 10-20 (3g, 15%), foi submetida à permeação em gel de Sephadex LH-20, utilizando como solvente a mistura $\text{C}_6\text{H}_{14}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (1:4) isolando um sólido branco, inodoro, pesando 30 mg (1%) que foi identificado como sendo o composto 5. A subfração 25-38 (4g, 20%), foi submetida à permeação em gel de Sephadex LH-20, utilizando como solvente a mistura $\text{C}_6\text{H}_{14}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (1:4) e forneceu um sólido branco, inodoro, pesando 100 mg (2,5%) que foi identificado como uma mistura dos compostos 7 e 8. Um outro sólido branco, inodoro, pesando 20 mg (0,5%) foi denominado composto 6. A subfração 40-55 (3g, 15%), foi submetida à CC em sílica gel impregnado com KOH, utilizando como sistema de eluição C_6H_{14} , CHCl_3 em várias proporções fornecendo o isolamento de sólido branco, escamoso, inodoro, pesando 100mg (3,33%) e denominado composto 1.

Referência

Andrade, J.C., Caruata, J.P.P. 1979. Associação Cecropia-Azteca na Restinga de Recreio dos Bandeirantes. Rio de Janeiro. Bradea **5**: 31-33.

Braga, R. 1960. Plantas do Nordeste Especialmente do Ceará. 4ª Ed., Editora Universitária – UFRN, Natal – RN.

Carauta, J.P.P. 1996. Moráceas do Estado do Rio de Janeiro, Albettoa 4, 191-192.

Consolini, A.E., Migliori, G.N. 2005. Cardiovascular effects of the South American medicinal plant *Cecropia pachystachya* (ambay) on rats. Journal of Ethnopharmacology 96, 417–422.

Consolini, A.E., Ragone, M.I., Migliori, G.N., Conforti, P., Volonté, M.G. 2006. Cardiotonic and sedative effects of *Cecropia pachystachya* Mart. (ambay) on isolated rat hearts and conscious mice. *Journal of Ethnopharmacology* 106, 90–96.

De Carvalho, M. G., Velandia, J. R., De Oliveira, L. F., Bezerra, F. B. 1998. Triterpenos isolados de *Eschweilera longipes* miers (lecythidaceae). *Química Nova* 21, 740-743.

De Moraes, S.M., Dantas, J.D.P., Da Silva, A.R.A., Magalhães, E.F. 2005. Plantas medicinais usadas pelos índios Tapebas do Ceará. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 15, 169-177.

Di Stasi, L. C. 1996. Plantas medicinais: Arte e Ciências. Um Guia de Estado Interdisciplinar. São Paulo: Editora da Universidade Estadual Paulista.

Hikawczuk V.J. Saad J.R. Guardia, T. Juarez A.O., Giordano O.S. 1998. Anti-Inflammatory Activity of Compounds Isolated from *Cecropia pachystachya*. *Anales de la Asociacion Quimica Argentina* 86, 167-170.

Jang, D.S., Su, B.N., Pawlus, A.D., Kang, Y.H., Kardono, L.B.S., Riswan, S., Afriastini, J.J., Fong, H.H.S., Pezzuto, J.M., Douglas, K.A. 2006. Beccaridiol, an unusual 28-nortriterpenoid from the leaves of *Diplectria beccariana*. *Phytochemistry* 67, 1832-1837.

Lobova, T.A., Mori, S.A., Blanchard, F., Peckham, H., Dominique, P.C. 2002. *Cecropia* as a food resource for bats in french guiana and the significance of fruit structure in seed dispersal and longevity. *American Journal of Botany* 90, 388-403.

Lontsi, D., Ngounou, N. F., Tapondjou, A. L., Sondegam, B. L., Bodo. B., Martin, M. T. 1998. An E-ring γ lactone pentacyclic triterpene from *Myrianthus serratus*. *Phytochemistry* 49, 2473-2476.

Mahano, S., Kundu, A. 1994. ^{13}C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids – A compilation and some salient features. *Phytochemistry* 37, 1517-1575.

Monte, F. Q., De Oliveira, E. F., Braz-Filho, R. 2001. Triterpenos pentacíclicos de *Mentha villosa*: Identificação estrutural e atribuição dos deslocamento químicos dos átomos de hidrogênio e carbono. *Química Nova* 24, 491-500.

Nes, W.D., Norton, R.A., Benson, M. 1992. Carbon-13 RMN studies on sitosterol biosynthesized from (^{13}C) mevalonates. *Phytochemistry* 31, 805-811.

Olea R.S.G, Roque N.F. 1990. Análise de misturas de triterpenos. *Química Nova* 13: 278-281.

Schinella, G., Aquila, S., Dade, M., Giner, R., Recio, M.C., Spegazzini, E., De Buschiazzi, P., Tournier, H., Rios, J.L. 2008. Anti-inflammatory and apoptotic activities of pomolic acid isolated from *Cecropia pachystachya*. *Planta Medica* 74, 215-220.

Soraru, S.B., Bandoni, A.L., 1978. Plantas de la medicina popular Argentina. Editorial Albatros, Buenos Aires, 76–78.

Taniguchi, S., Imayoshi, Y., Kobayashi, E., Takamatsu, Y., Ito, H., Hatano, T., Sakagami, H., Tokuda, H., Nishino, H., Sugita, D., Shimura, S., Yoshida, T. 2002. Production of Bioactive Triterpenes by *Eribotrya japonica* Calli. *Phytochemistry* 59, 315-323.

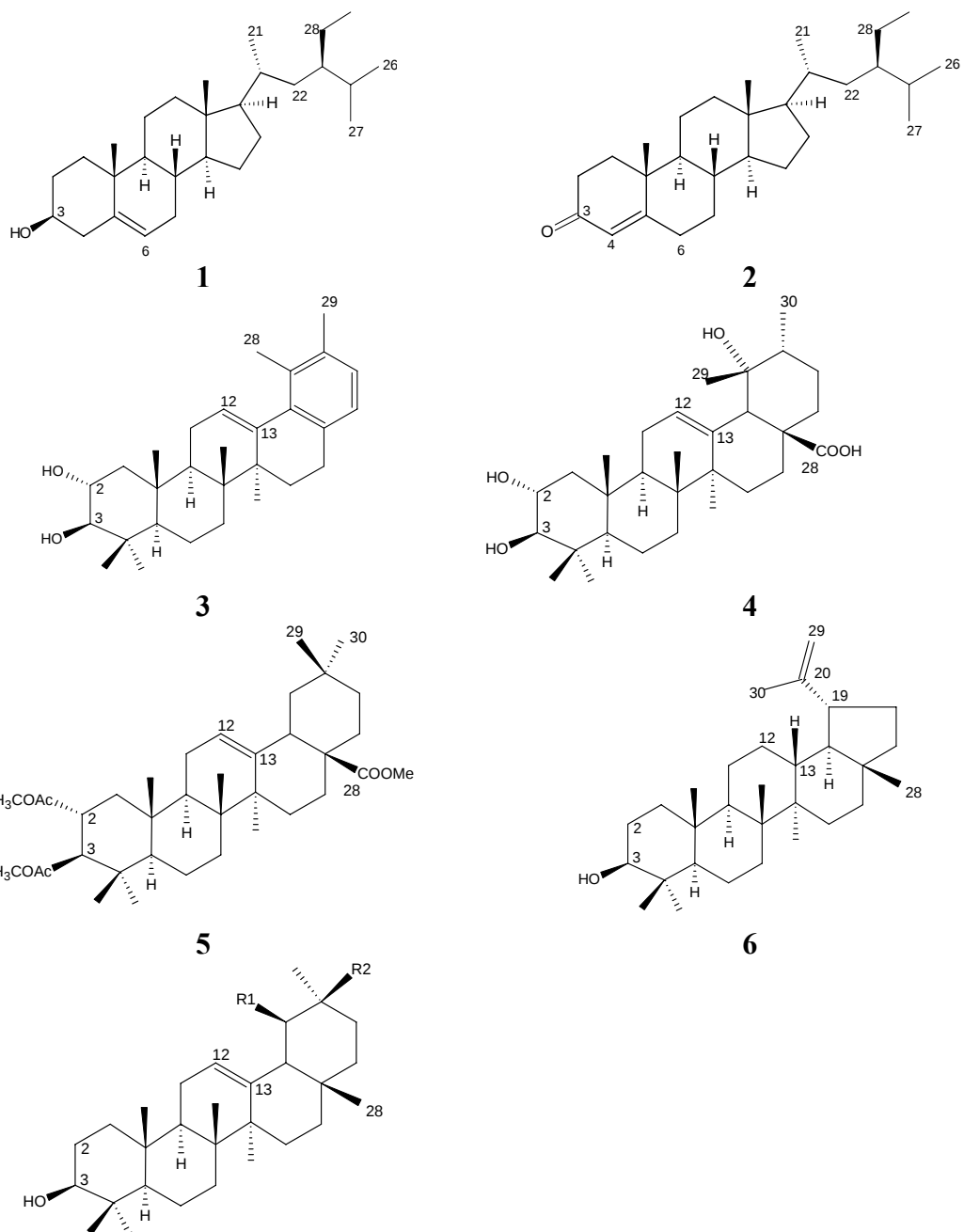
Velázquez, E., Tournier, H.A., Buschiazzi, P.M., Saavedro, G., Schinella, G.R. 2003. Antioxidant Activity of Paraguayan Plant Extracts. *Fitoterapia* 74, 91-97.

Legenda para figura:

Figura 1: Estruturas das substâncias isoladas do caule da *C. pachystachya*

Legenda para tabela:

Tabela 01. Deslocamento químico de RMN¹³C dos compostos isolados



7: $R_1 = \text{CH}_3$; $R_2 = \text{H}$

8: $R_1 = \text{H}$; $R_2 = \text{CH}_3$

Figura 1: Estruturas das substâncias isoladas do caule da *C. pachystachya*

Tabela 01. Deslocamentos químicos de RMN¹³C dos compostos isolados

Nº	01	02	03	04	05	06	07
1	31,25	39,63	47,27	41,74	38,63	38,90	38,98
2	31,69	34,05	69,49	66,17	68,42	27,60	27,44
3	71,83	199,68	84,32	79,11	80,78	79,20	79,26
4	43,00	123,75	39,65	38,47	38,12	39,00	38,90
5	140,28	172,73	56,01	48,52	49,44	55,50	55,39
6	121,73	32,46	18,64	18,30	17,84	18,50	18,56
7	31,69	30,11	34,19	33,07	32,37	34,50	33,15
8	31,93	36,52	40,40	41,49	39,93	41,00	40,22
9	50,16	56,29	48,14	47,31	47,00	50,60	47,93
10	36,53	39,01	38,67	38,03	38,40	37,30	37,10
11	21,10	20,22	23,89	23,72	23,60	21,10	23,48
12	39,80	28,59	125,53	128,53	128,50	25,30	121,60/ 124,60
13	42,33	42,68	139,30	139,08	138,27	38,30	145,10/ 140,00
14	56,79	54,23	44,58	41,50	41,27	43,00	42,30
15	24,32	21,44	32,53	28,61	25,90	27,60	28,96
16	28,26	36,02	31,37	25,61	25,33	35,70	26,82
17	56,08	56,42	138,81	48,01	47,58	43,20	33,96
18	11,87	12,38	139,00	54,08	41,05	48,50	59,28
19	19,40	17,79	134,17	72,60	43,76	48,20	39,87
20	36,16	36,03	135,50	42,10	32,55	151,10	39,82
21	18,79	18,66	127,73	23,93	28,07	30,00	31,46
22	31,93	33,36	123,28	38,40	37,43	40,20	37,20
23	26,12	26,48	17,28	28,26	28,40	28,20	28,31
24	45,87	46,24	29,03	21,47	21,53	15,50	15,24
25	29,19	29,65	17,67	15,90	16,09	16,33	15,88
26	19,82	19,11	17,28	16,56	16,66	16,20	17,07
27	19,05	19,44	27,75	26,09	26,03	14,70	23,57
28	23,09	24,59	17,28	181,36	181,28	18,20	27,47
29	11,99	12,36	21,23	26,30	24,50	109,50	17,67
30				15,62	23,71	19,30	21,60
AcO-2 (C)					171,38		
AcO-3 (C)					171,03		
AcO-2 (CH ₃)					21,05		
AcO-3 (CH ₃)					20,97		
MeO-28					53,14		

CONCLUSÕES

Considerando os resultados obtidos na investigação de literatura, biológica e fitoquímica, é possível concluir que:

- a) As famílias Cecropiaceae e Olacaceae possuem atividade biológica antihipotensiva, antibacteriana, analgésica, anti-inflamatória e antidiabética, relatados na literatura, comprovando e justificando o uso destas espécies na medicina popular.
- b) As espécies *Cecropia pachystachya* (Cecropiaceae) e *Ximenia americana* (Olacaceae) possuem atividade biológica antiinflamatória, antiplasmodial, cardiotônica etc, em análise fitoquímica foi possível observar principalmente a presença de terpenos e ácidos graxos. Ressaltando que ambas possuem pouco constituintes químicos isolados e identificados na literatura.
- c) Várias famílias e espécies são consideradas promissoras na procura de antimaláricos de origem natural e/ou compostos que podem servir como modelos para síntese de novas estruturas.
- d) Os extratos etanólicos das folhas e do caule da *X. americana*, apresentaram-se parcialmente ativos em testes antimaláricos *in vivo* e *in vitro*. Das frações em acetato de etila das folhas isolou-se a quercetina ativa contra cepas resistentes a cloroquina do *Plasmodium falciparum*.
- e) Os extratos etanólicos das raízes da *C. pachystachya*, apresentaram-se parcialmente ativos em testes antimaláricos *in vivo* e *in vitro*, de onde isolou-se o ácido tormêntico com atividade *in vitro* e *in vivo* frente às cepas do *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium berghei*.
- f) Os extratos etanólicos das cascas do caule, folhas e frações em acetato de etila das folhas apresentaram alta capacidade antioxidante e teor de fenóis totais. Da fração em acetato de etila das folhas e das cascas do caule foram isolados os compostos quercetina e

epicatequina, respectivamente, sendo que estas substâncias podem ser responsáveis pela ação antioxidante da planta.

- g) Os extratos, frações e composto isolado de *X. americana* possuem efeitos antinociceptivo e antiinflamatório significativos em animais de laboratório, nas doses estudadas.
- h) Da fração em hexano das raízes da *C. pachystachya* foi possível isolar seis triterpenos e dois esteróides, sendo que dois foram isolados pela primeira vez na espécie.

REFERÊNCIAS

Bresolin, T. M. R and Chechinell-Filho, V. 2003. **Ciências Químico-Farmacêuticas: Contribuição ao Desenvolvimento de Novos Fármacos e Medicamentos**. 1ª Ed., Editora-UNIVALI, Itajaí (SC).

Calixto, J.B. 2005. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal view. **Journal of Ethnopharmacology** 100, 131–134.

Consolini, A. E., Ragone, M. A., Migliori, G. N., Conforti, P., Volonté, M. G. 2006. Cardiotonic and sedative effects of *Cecropia pachystachya* Mart. (ambay) on isolated rat hearts and conscious mice. **Journal of Ethnopharmacology** 106, 90–96.

Coutinho, D. F., Travassos, L. M. A., Amaral, F. M. M. 2002. Estudo etnobotânico de plantas medicinais utilizadas em comunidades indígenas no estado do Maranhão – Brasil. **Visão Acadêmica**, Curitiba, 3, 7-12.

Di Stasi, L. C. 1996. **Plantas medicinais: Arte e Ciência. Um guia de Estudo Interdisciplinar**; São Paulo: Editora da Universidade Estadual Paulista.

Omer, M.E.F.A., Elimina, E.I., 2003. Antimicrobial activity of *Ximenia americana*. **Fitoterapia** 74, 122-126.

Parveen, B. U., Shikha, R., Ashwani, K. 2007. Traditional uses of medicinal plants among the rural communities of Churu district in the Thar Desert, India. **Journal of Ethnopharmacology** 113, 387–399.

Yunes, R. A. e Cechinel-Filho, V. 2007. **Química de Produtos Naturais, Novos Fármacos e a Moderna Farmacognosia**. 1ª Ed, Editora-UNIVALI, Itajaí (SC).

ANEXOS

Figura 01. Espectro na região do infravermelho do β -sitosterol em KBr

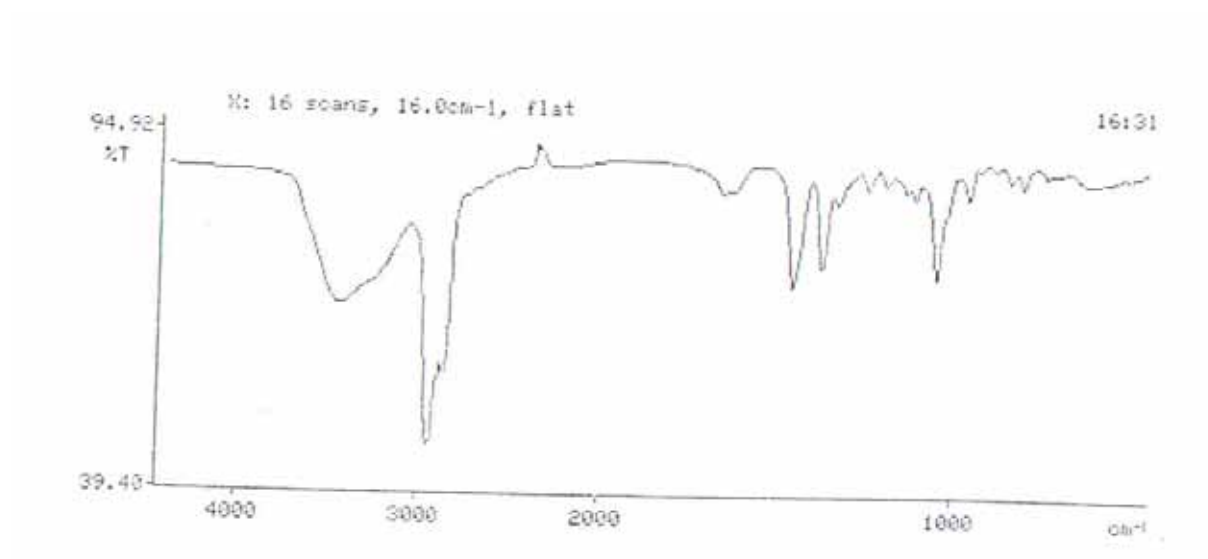


Figura 02. Espectro de RMN¹H (400 MHz, CDCl₃) do β -sitosterol

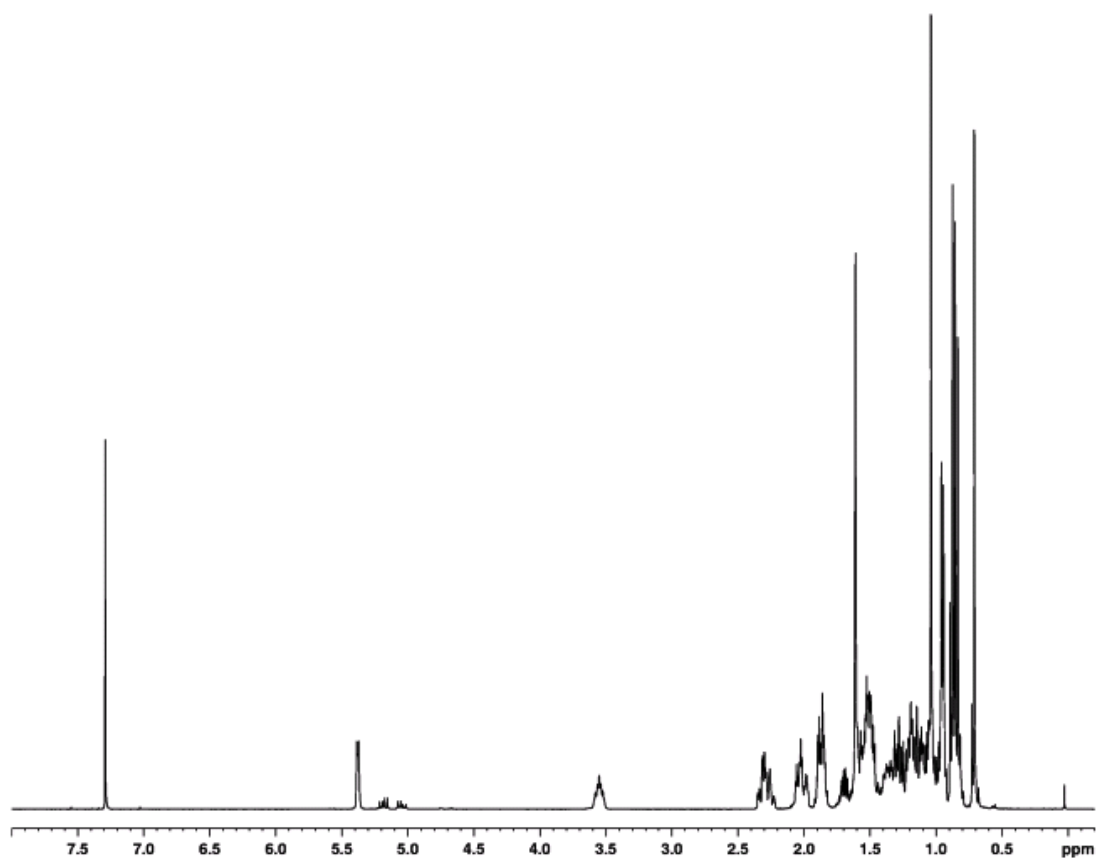


Figura 03. Espectro de RMN¹³C (100 MHz, CDCl₃) do β- sitosterol

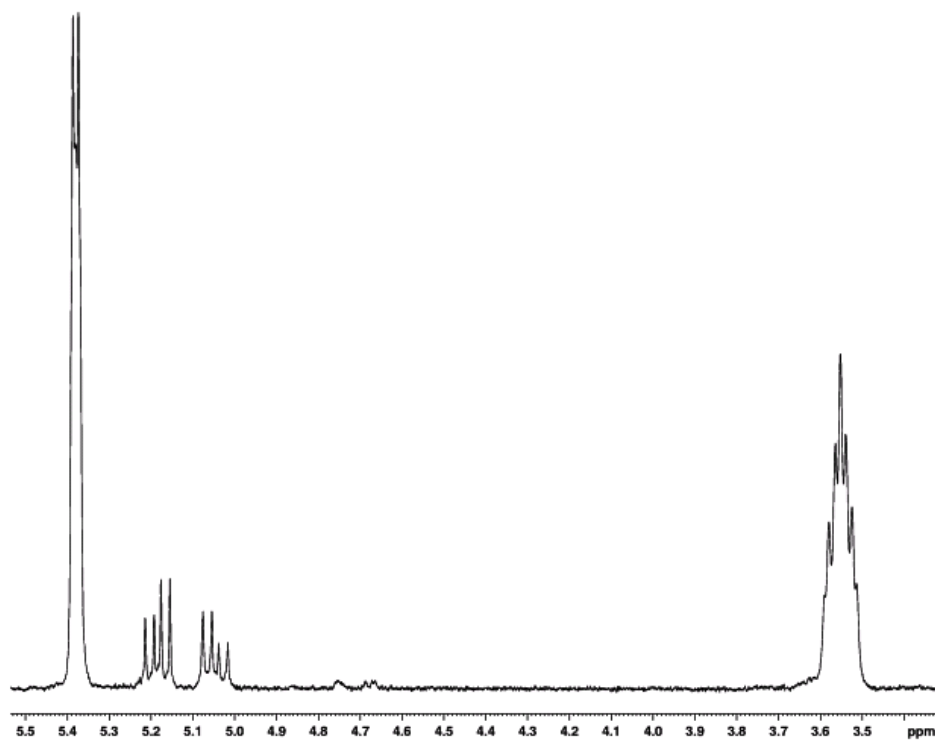


Figura 04. Espectro de DEPT 135°(100 MHz, CDCl₃) do β- sitosterol

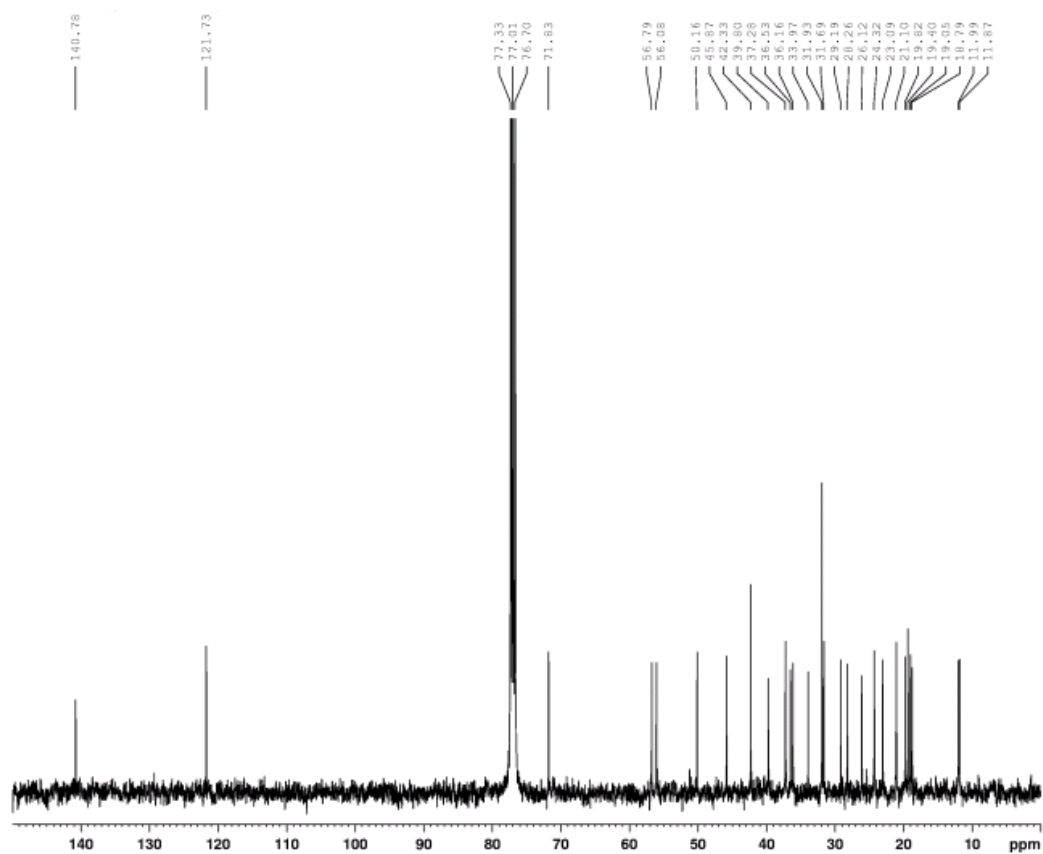


Figura 05. Espectro na região do infravermelho da sitostenona em KBr

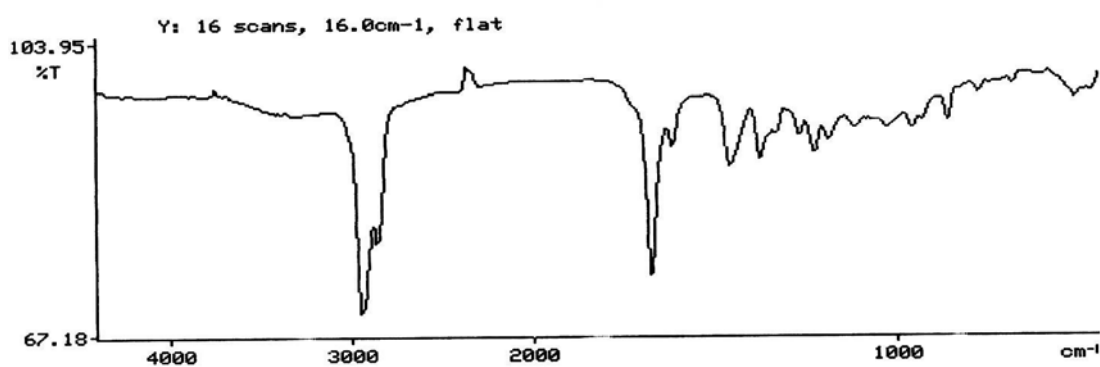


Figura 06. Espectro de RMN¹H (400 MHz, CDCl₃) da sitostenona

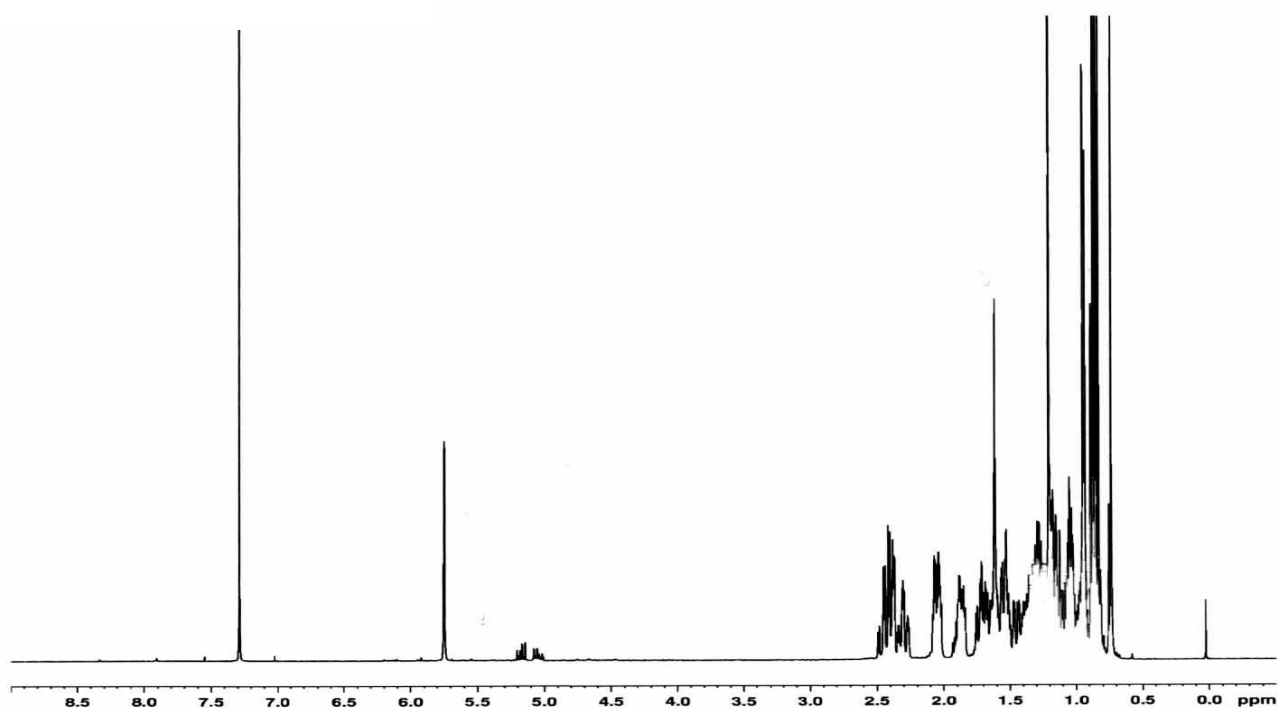


Figura 07. Espectro de RMN¹³C (100 MHz, CDCl₃) da sitostenona

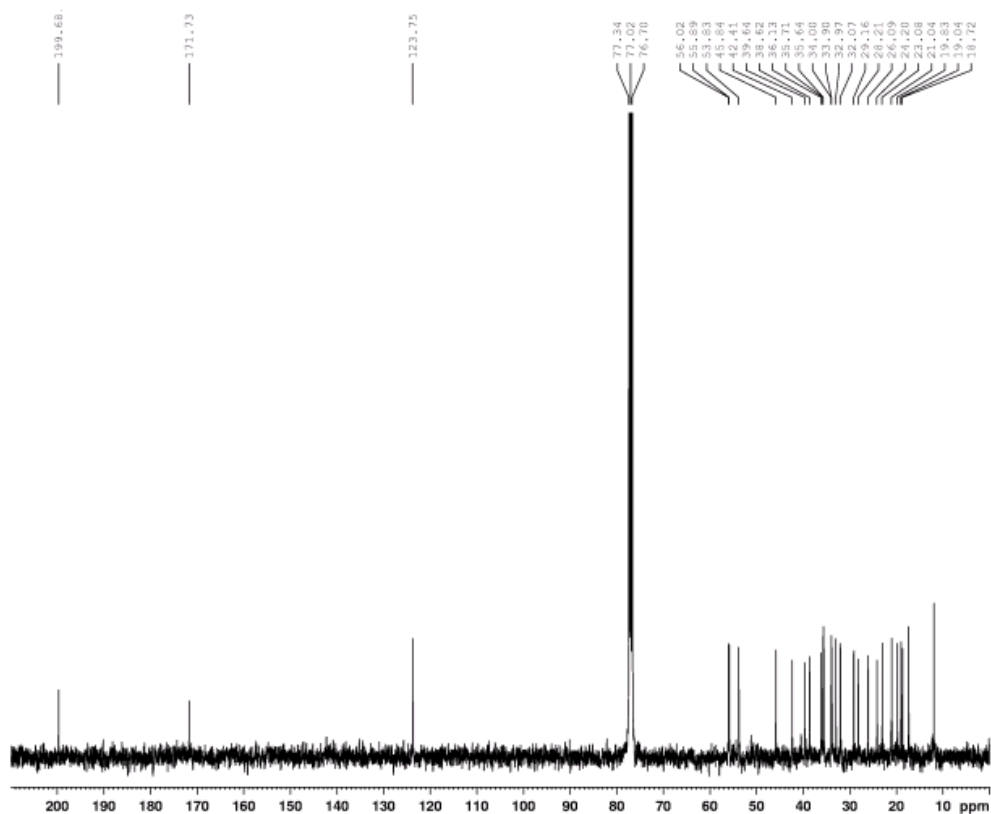


Figura 08. Espectro de DEPT 135°(100 MHz, CDCl₃) da sitostenona

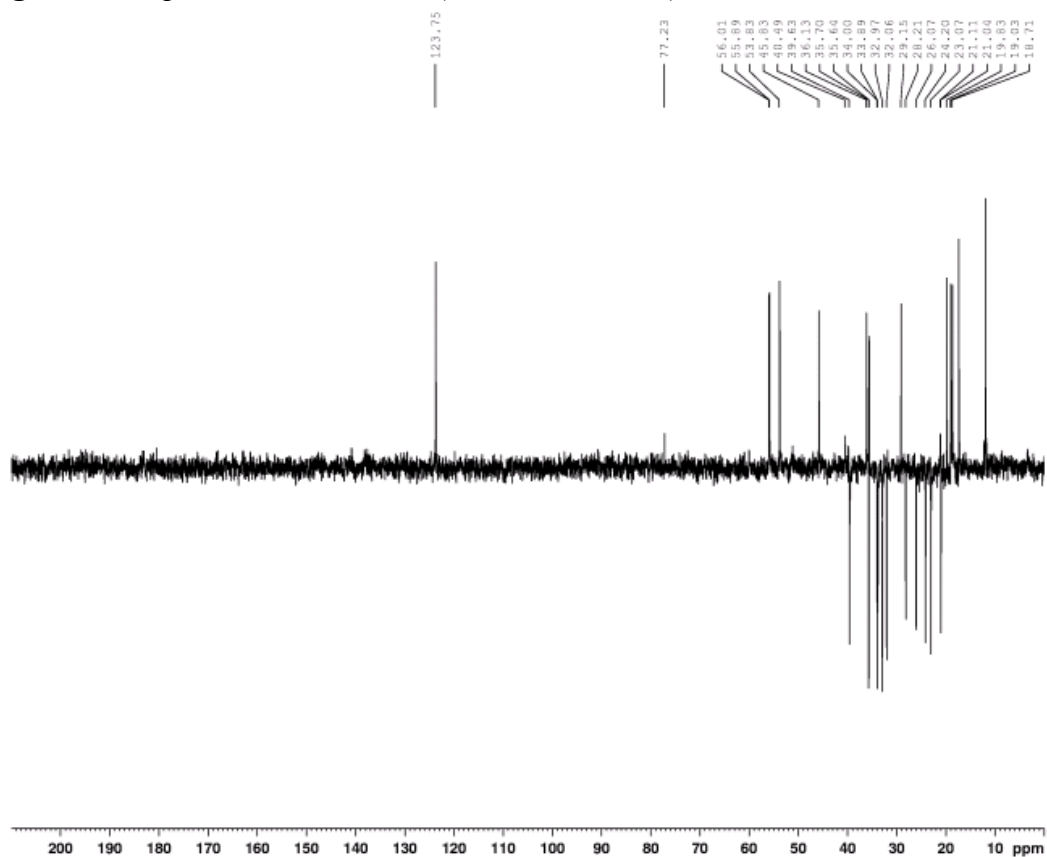


Figura 09. Espectro na região do infravermelho do (2R,3R)-28-norursa-12-17-19-21-tetraen-2 α ,3 β -diol (beccaridiol) em KBr

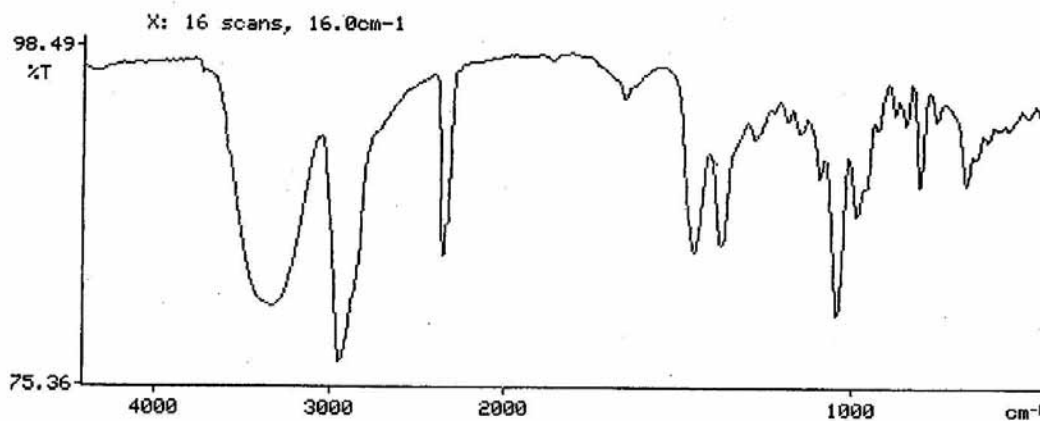


Figura 10. Espectro de RMN¹H (500 MHz, CDCl₃) do (2R,3R)-28-norursa-12-17-19-21-tetraen-2 α ,3 β -diol (beccaridiol)

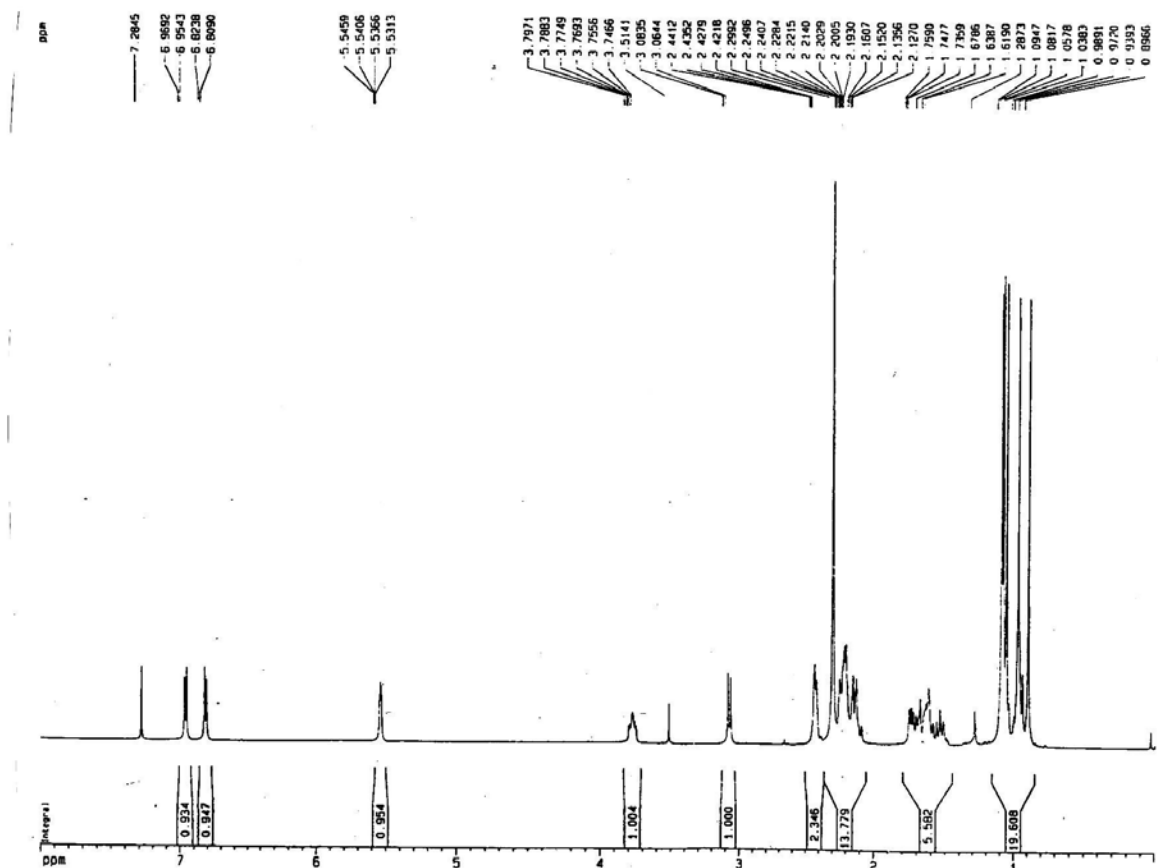


Figura 11. Espectro de RMN¹³C (125 MHz, CDCl₃) do (2R,3R)-28-norursa-12-17-19-21-tetraen-2 α ,3 β -diol (beccaridiol)

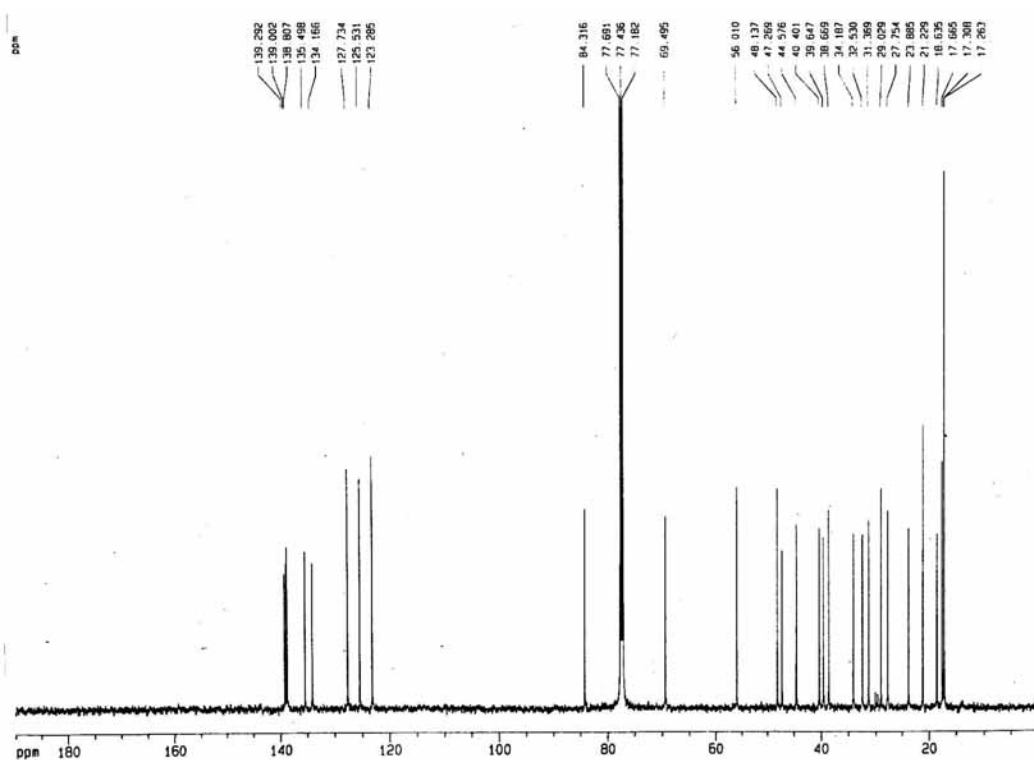


Figura 12. Espectro de DEPT 135° (125 MHz, CDCl₃) do (2R,3R)-28-norursa-12-17-19-21-tetraen-2 α ,3 β -diol (beccaridiol)

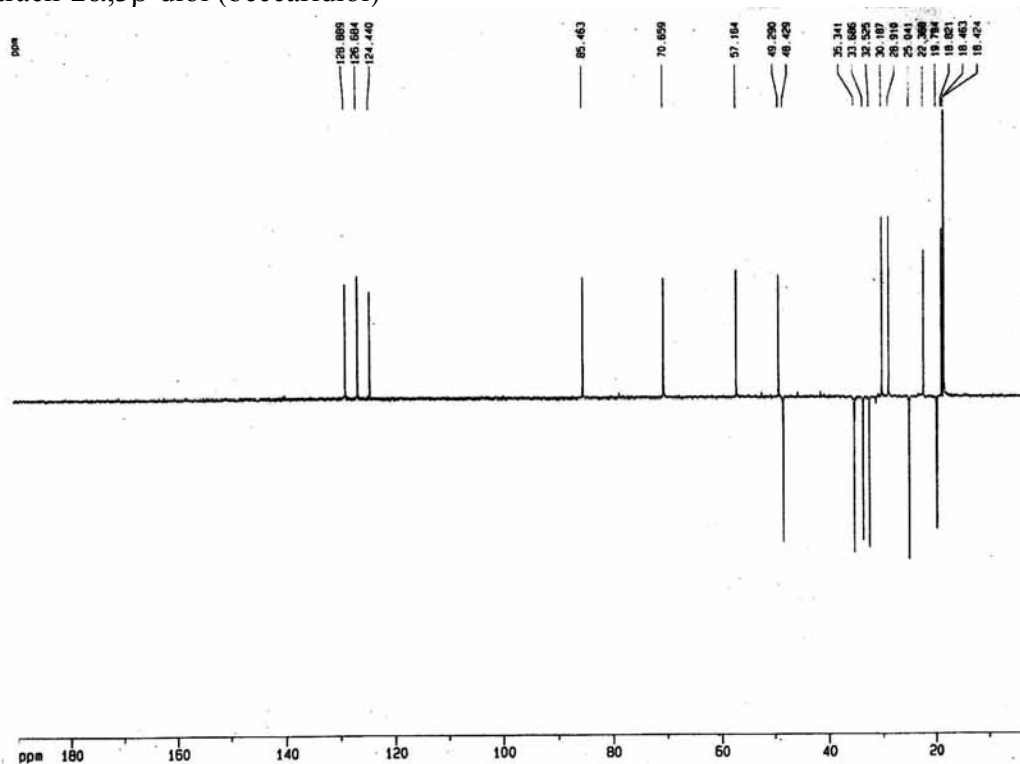


Figura 13. Espectro de COSY (^1H : 500 MHz, CDCl_3) do (2R,3R)-28-norursa-12-17-19-21-tetraen-2 α ,3 β -diol (beccaridiol)

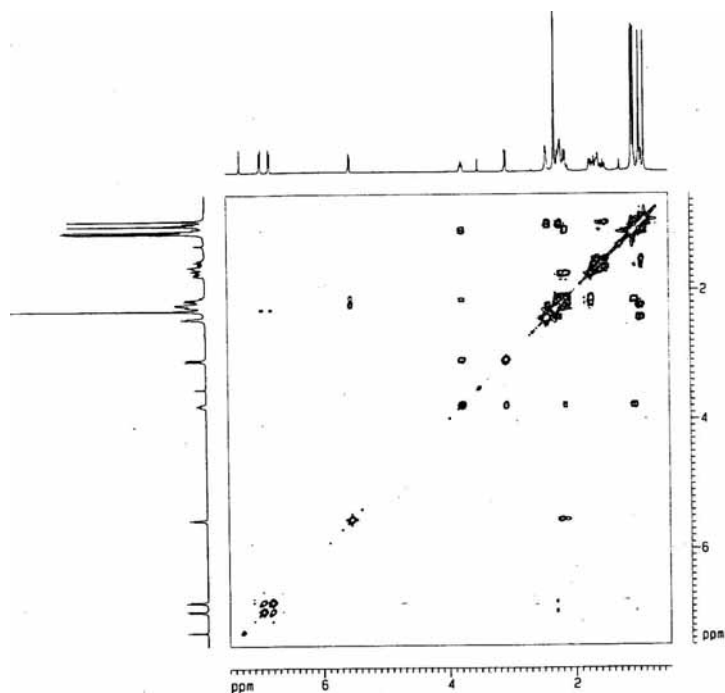


Figura 14. Espectro de HMQC e HMBC (^1H : 500 MHz, ^{13}C : 125 MHz CDCl_3) do (2R,3R)-28-norursa-12-17-19-21-tetraen-2 α ,3 β -diol (beccaridiol)

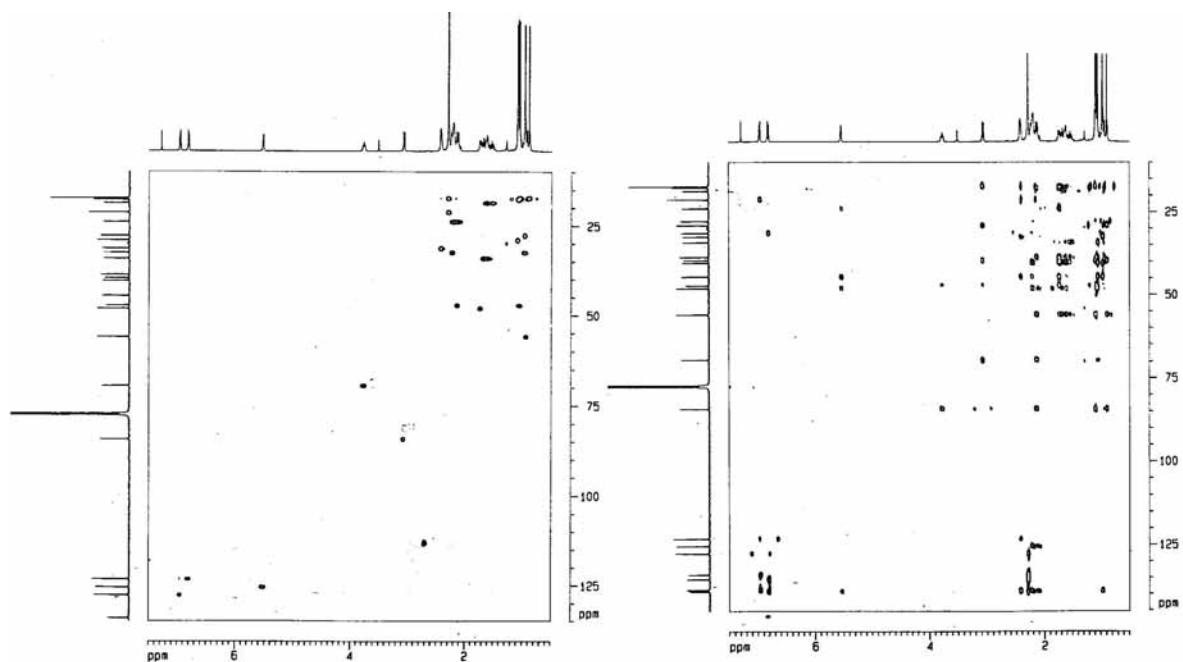


Figura 15. Espectro na região do infravermelho do ácido tormêntico em KBr

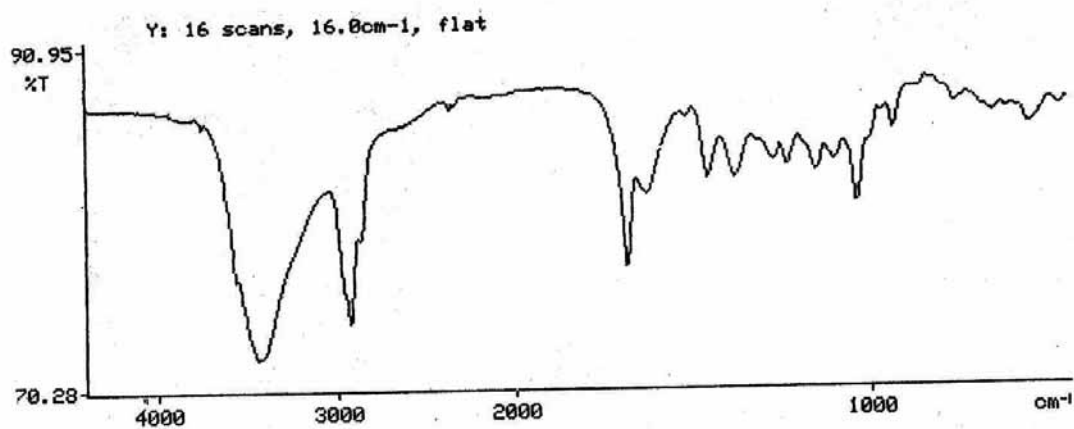


Figura 16. Espectro de RMN¹H (500 MHz, CD₃OD) do ácido tormêntico

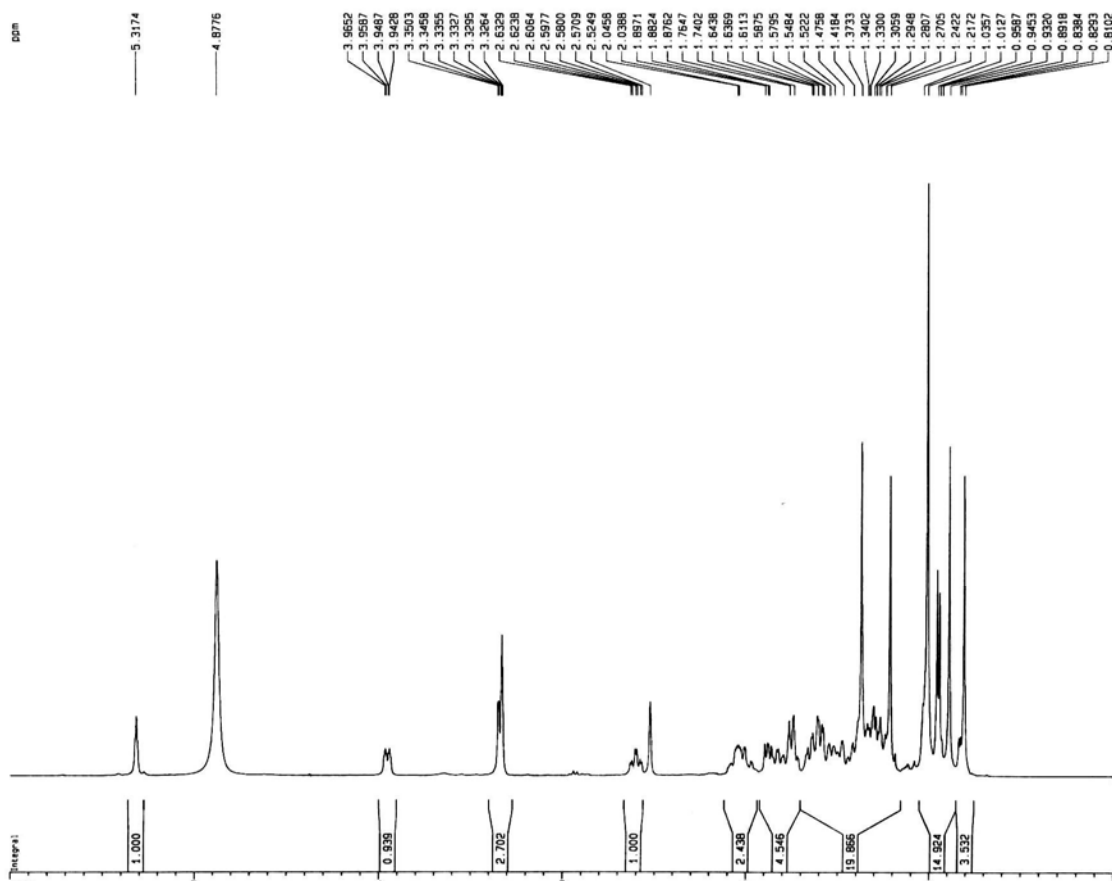


Figura 17. Espectro de RMN¹³C (125 MHz, CD₃OD) do ácido tormêntico

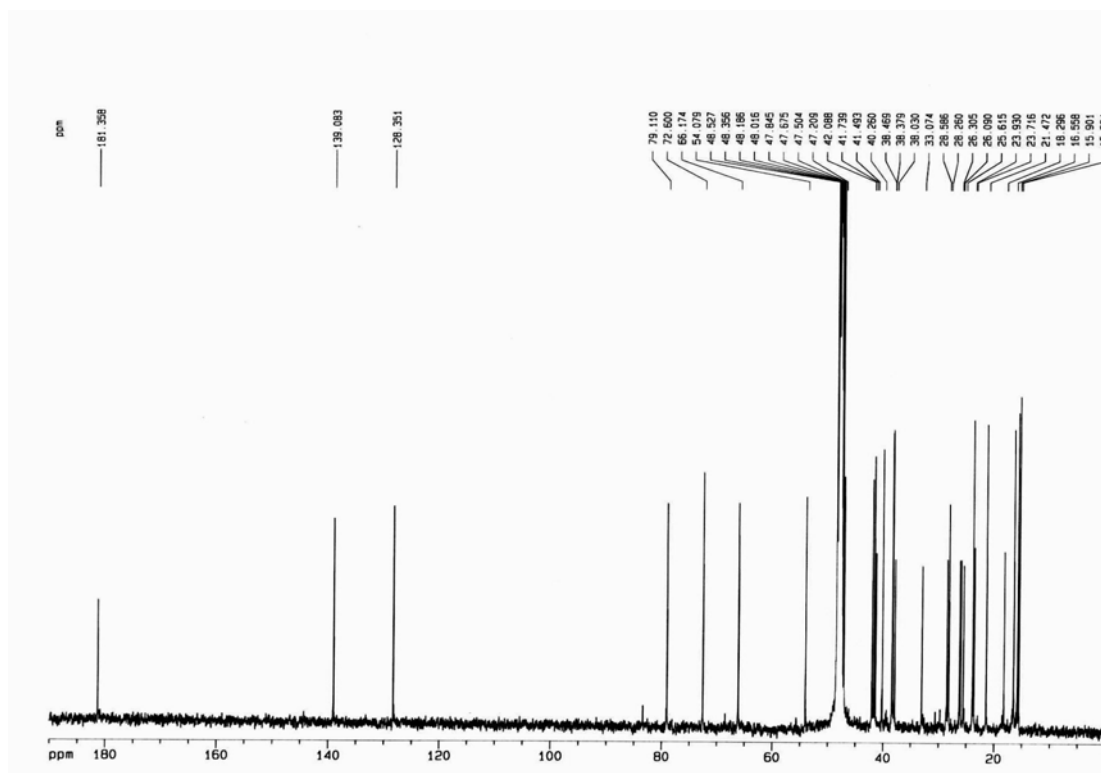


Figura 18. Espectro de DEPT 135° (125 MHz, CD₃OD) do ácido tormêntico

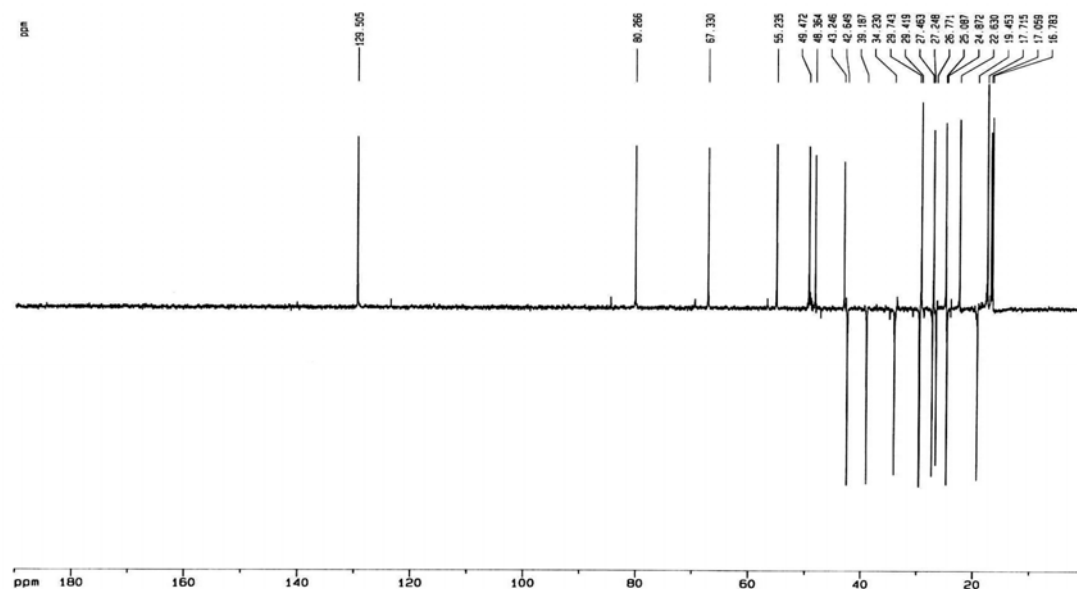


Figura 19. Espectro de COSY (^1H : 500 MHz, CD_3OD) do ácido tormêntico

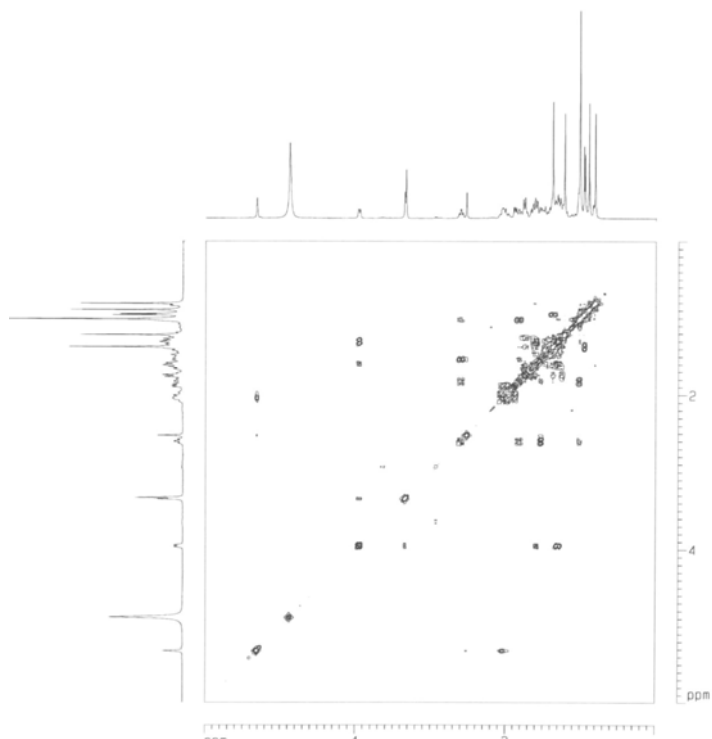


Figura 20. Espectro de HMQC e HMBC (^1H : 500 MHz, ^{13}C : 125 MHz CD_3OD) do ácido tormêntico

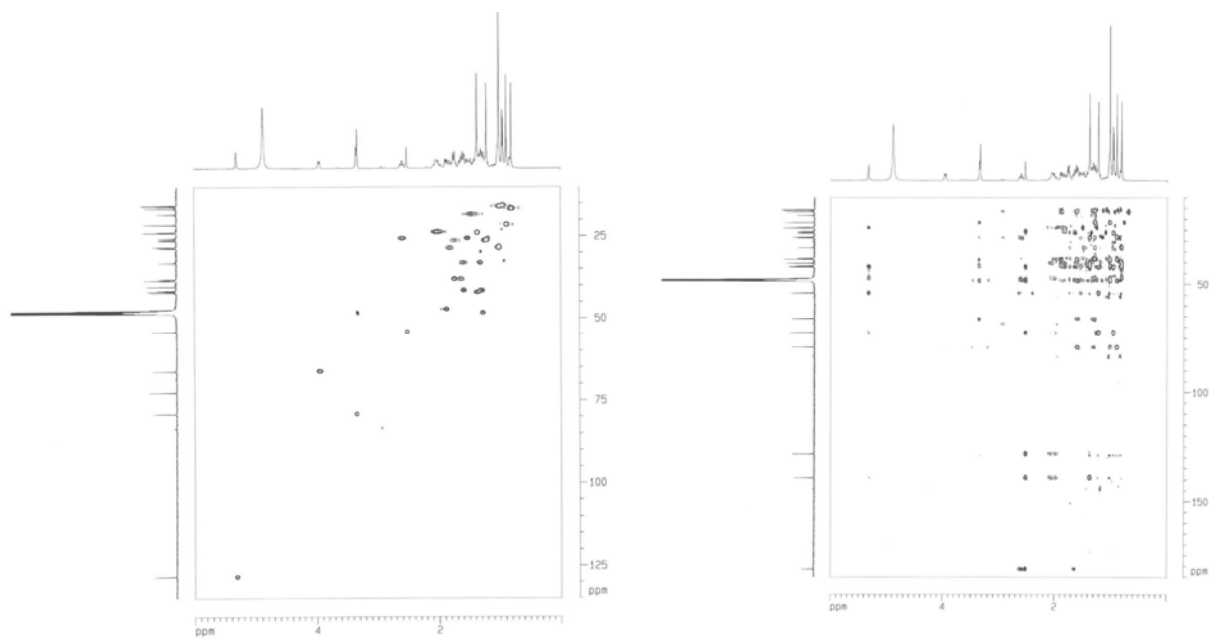


Figura 21. Espectro na região do infravermelho do 2 α ,3 α -di-O-acetilolean-12-em-28-ato-de metila em KBr

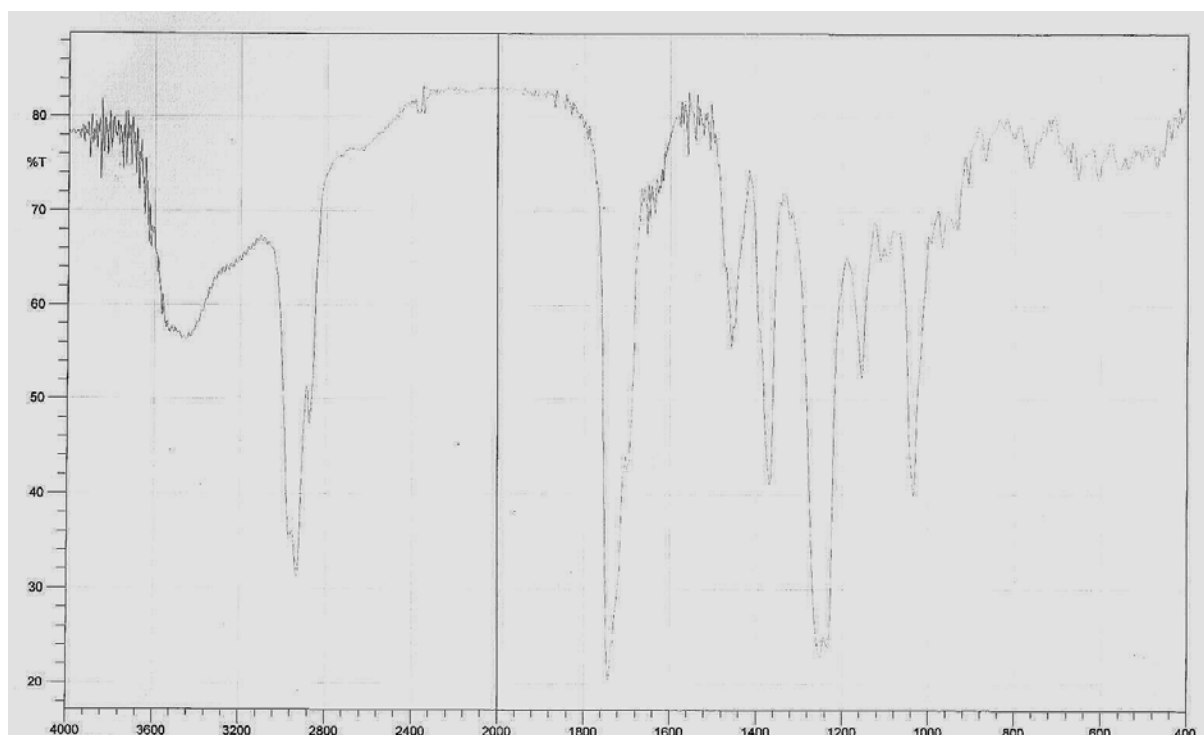


Figura 22. Espectro de RMN¹H (400 MHz, CDCl₃ + CD₃OD) do 2 α ,3 α -di-O-acetilolean-12-em-28-ato-de metila

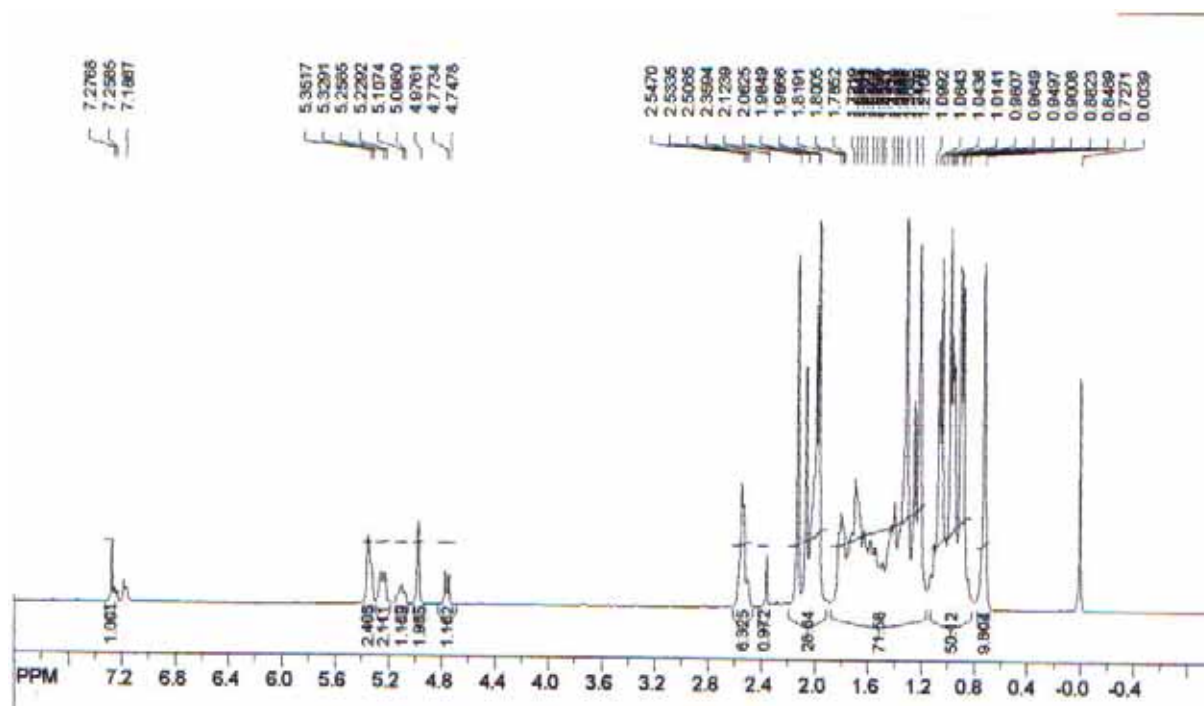


Figura 23. Espectro de RMN¹³C (100 MHz, CDCl₃ + CD₃OD) do $\alpha,3\alpha$ -di-O-acetilolean-12-em-28-ato-de metila

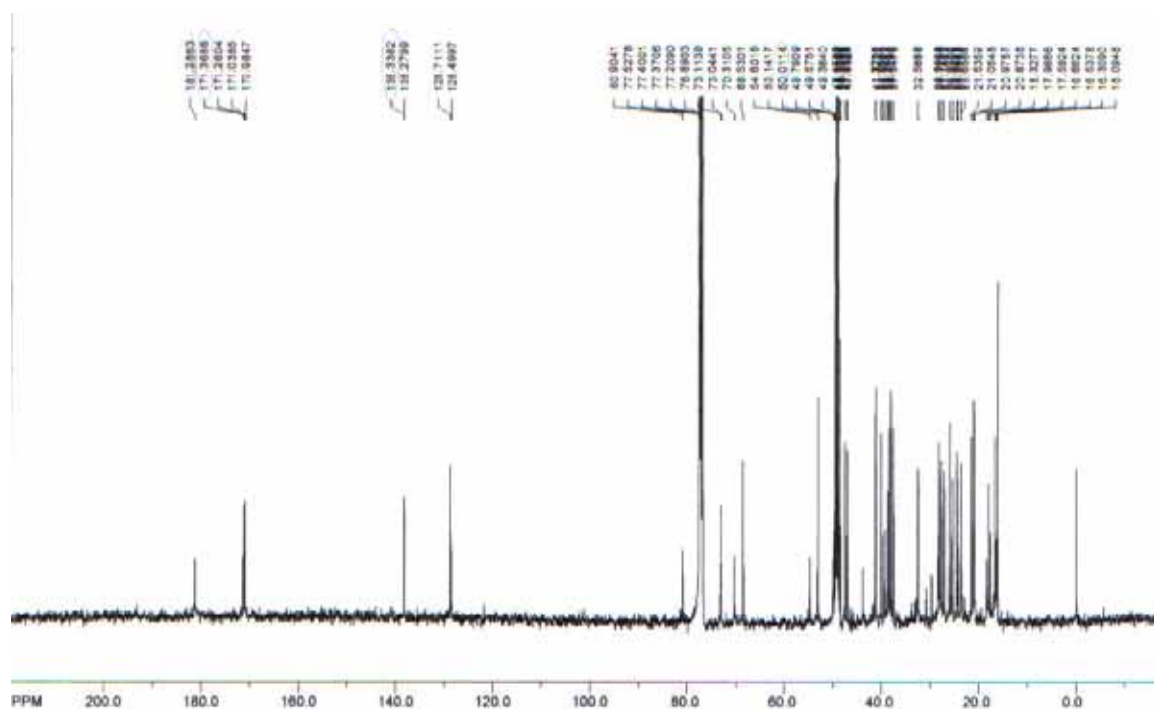


Figura 24. Espectro de DEPT 135° (100 MHz, CDCl₃ + CD₃OD) do $\alpha,3\alpha$ -di-O-acetilolean-12-em-28-ato-de metila

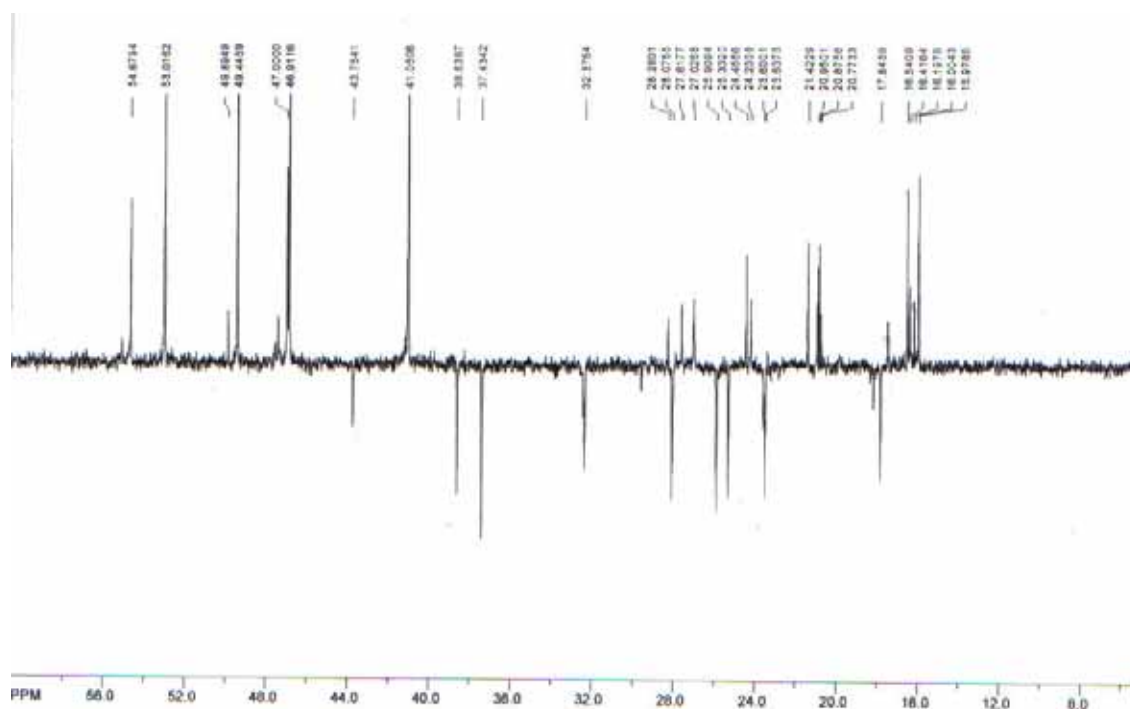


Figura 25. Espectro na região do infravermelho da (-)epicatequina em KBr

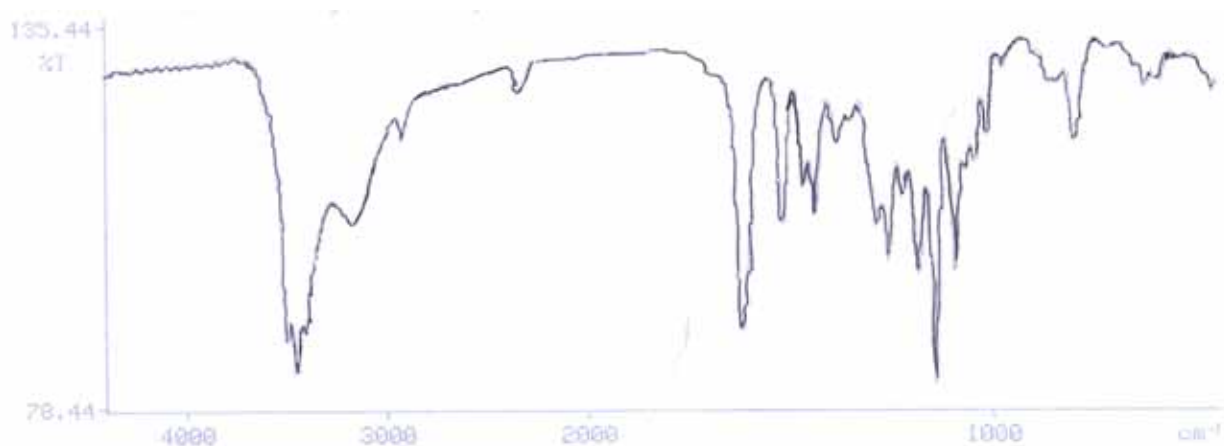


Figura 26. Espectro de RMN¹H (500 MHz, CD₃OD) da quercetina

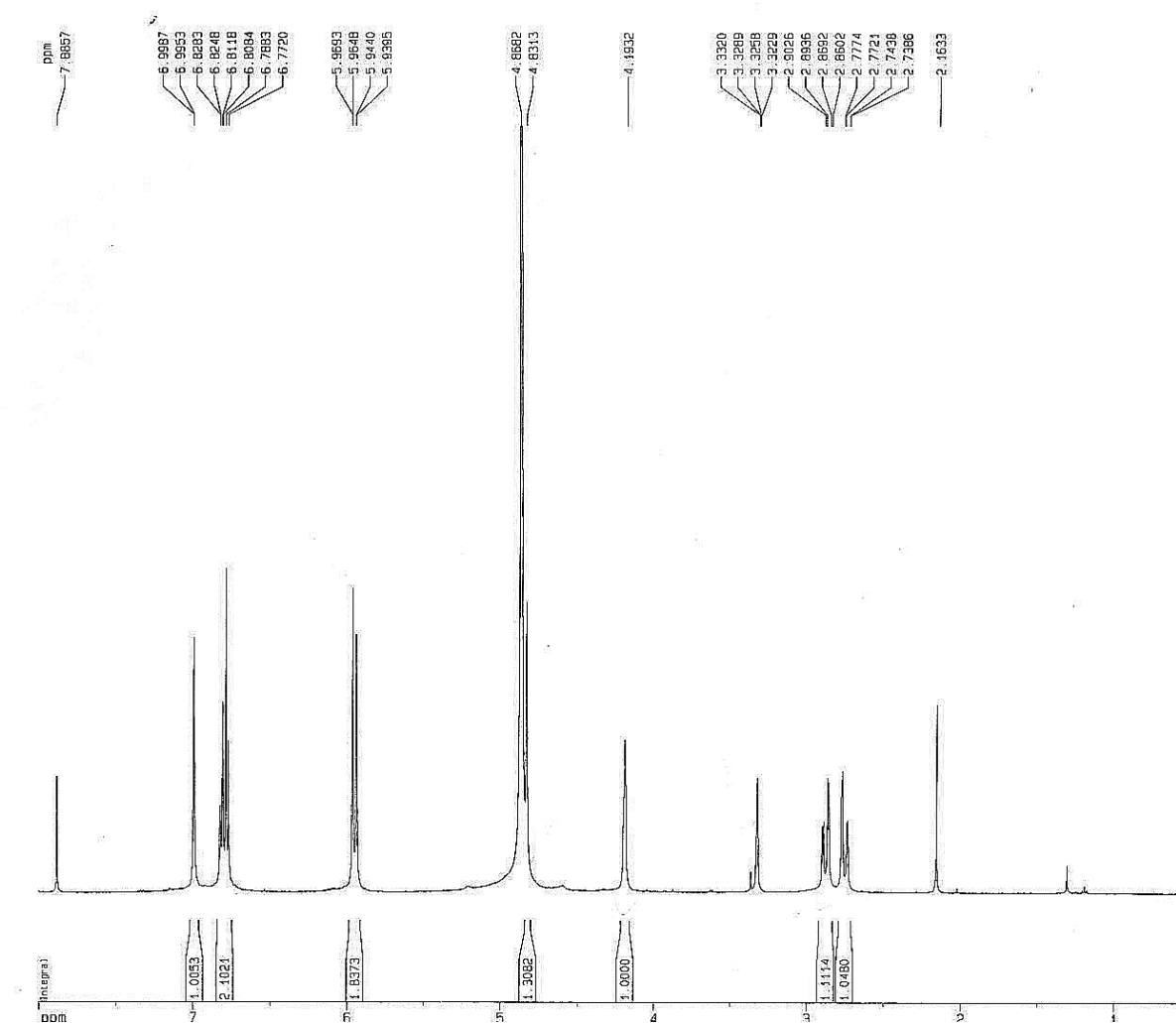


Figura 27. Espectro de RMN¹³C (125 MHz, CD₃OD) da quercetina

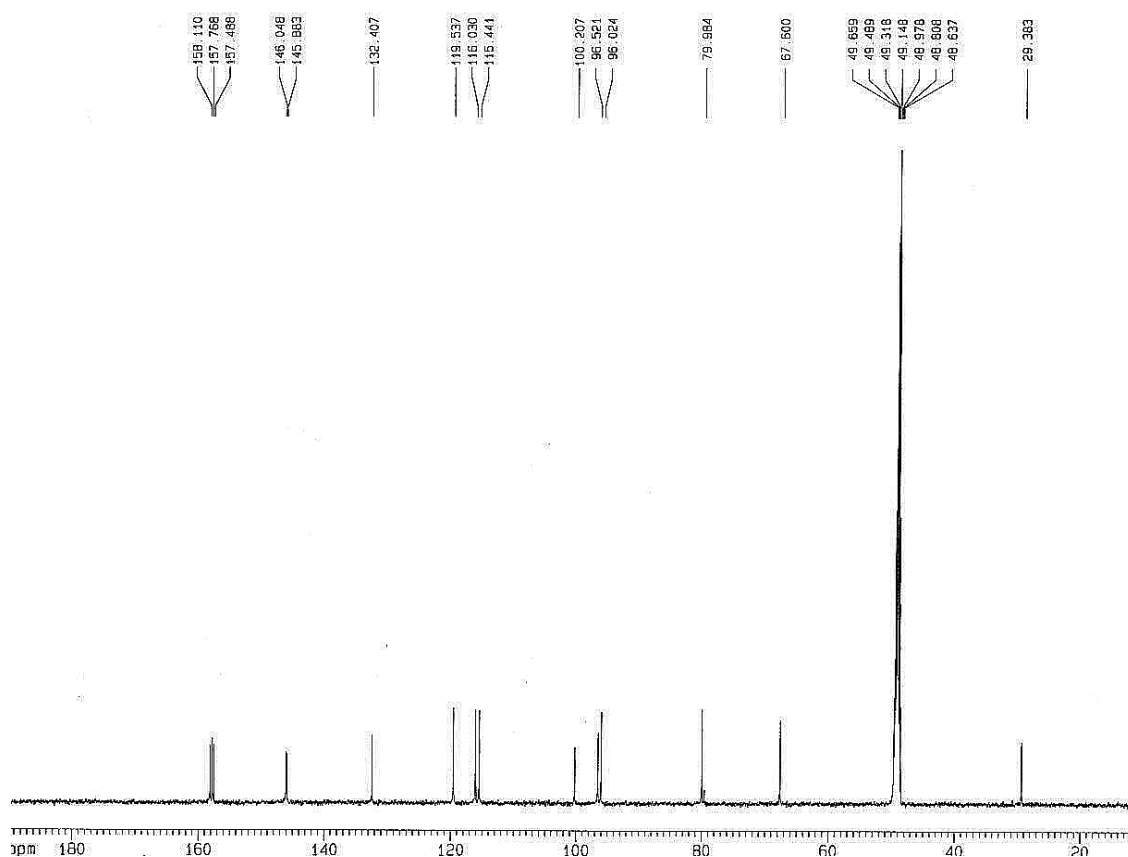


Figura 28. Espectro de DEPT 135° (125 MHz, CD₃OD) da quercetina

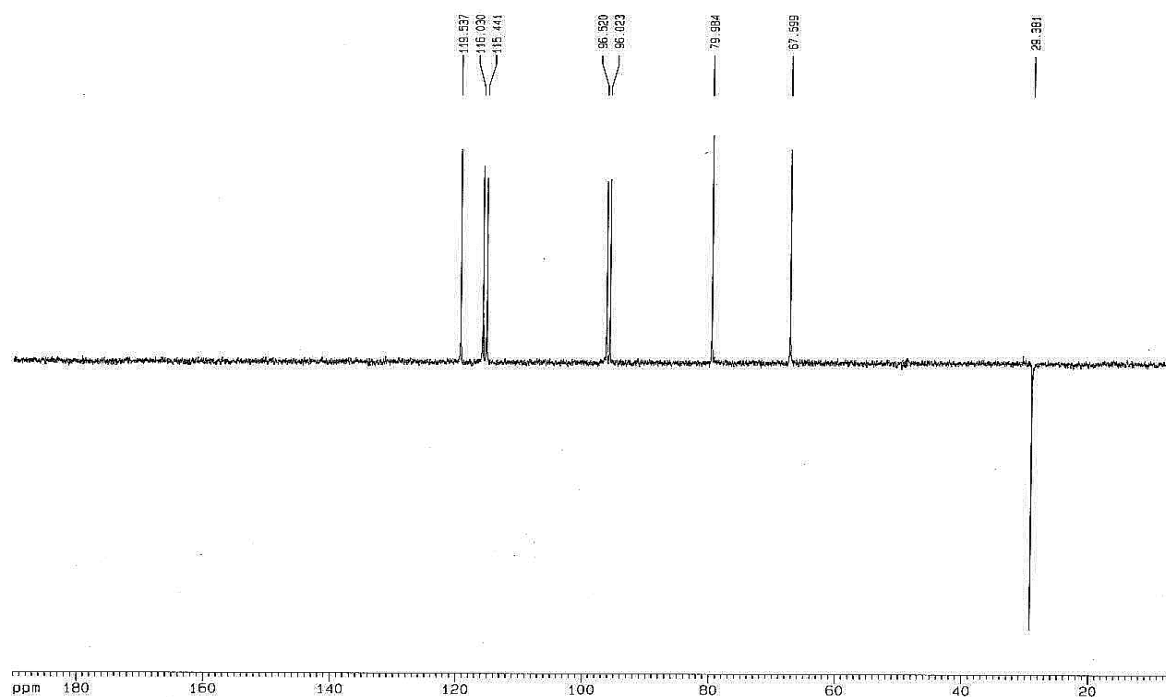


Figura 29. Espectro de COSY (^1H : 500 MHz, CD_3OD) da epicatequina

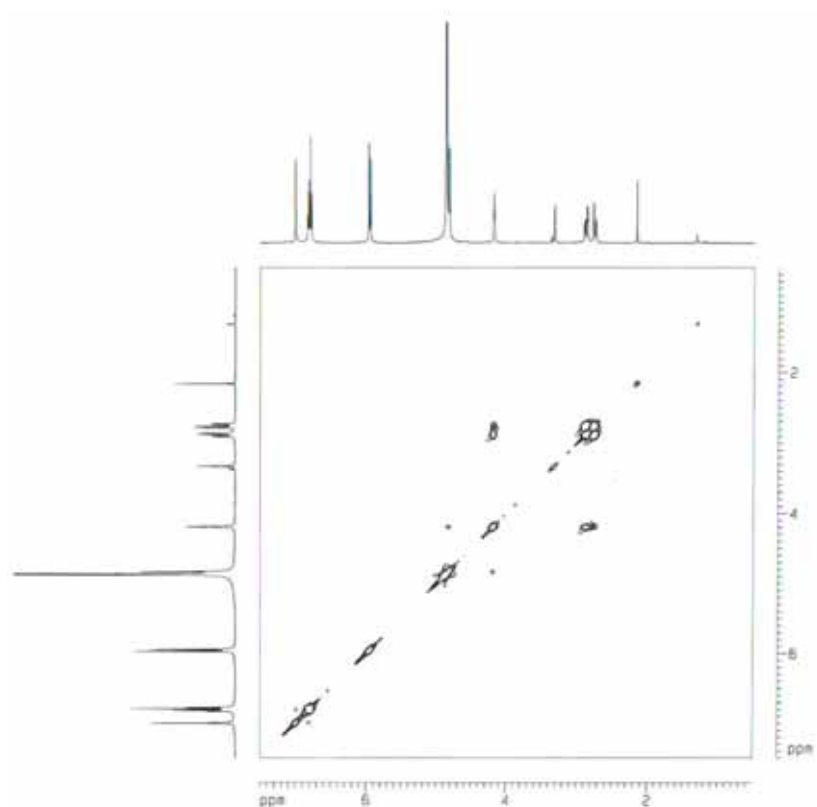


Figura 30. Espectro de HMQC e HMBC (^1H : 500 MHz, ^{13}C : 125 MHz CD_3OD) da epicatequina

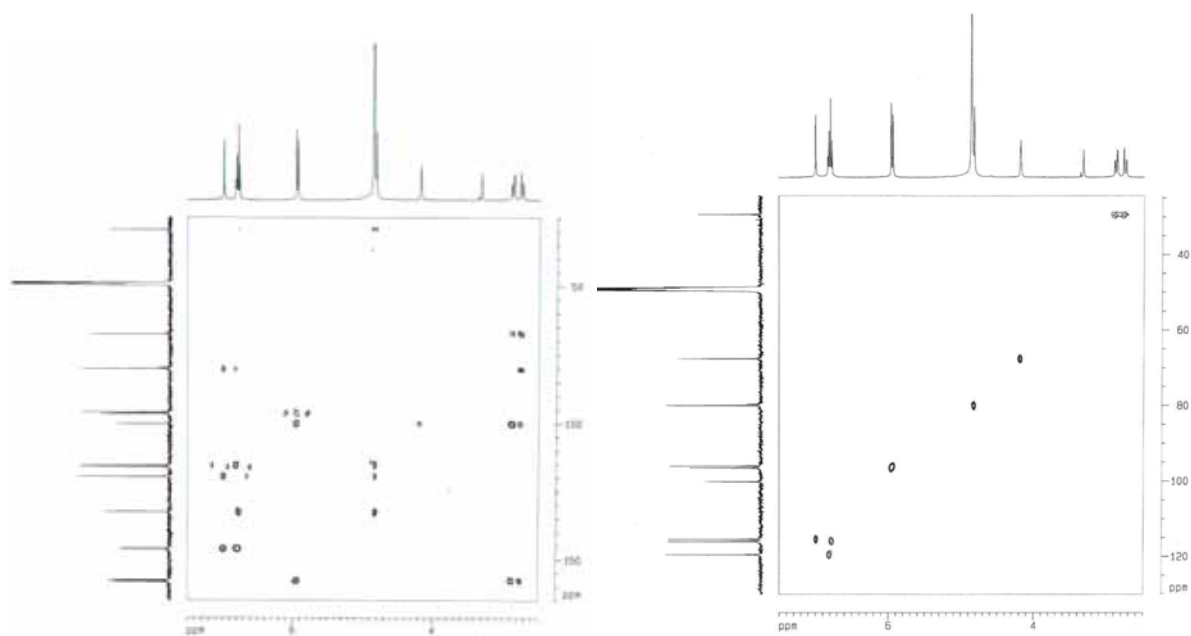


Figura 31. Espectro na região do infravermelho da quercetina em KBr

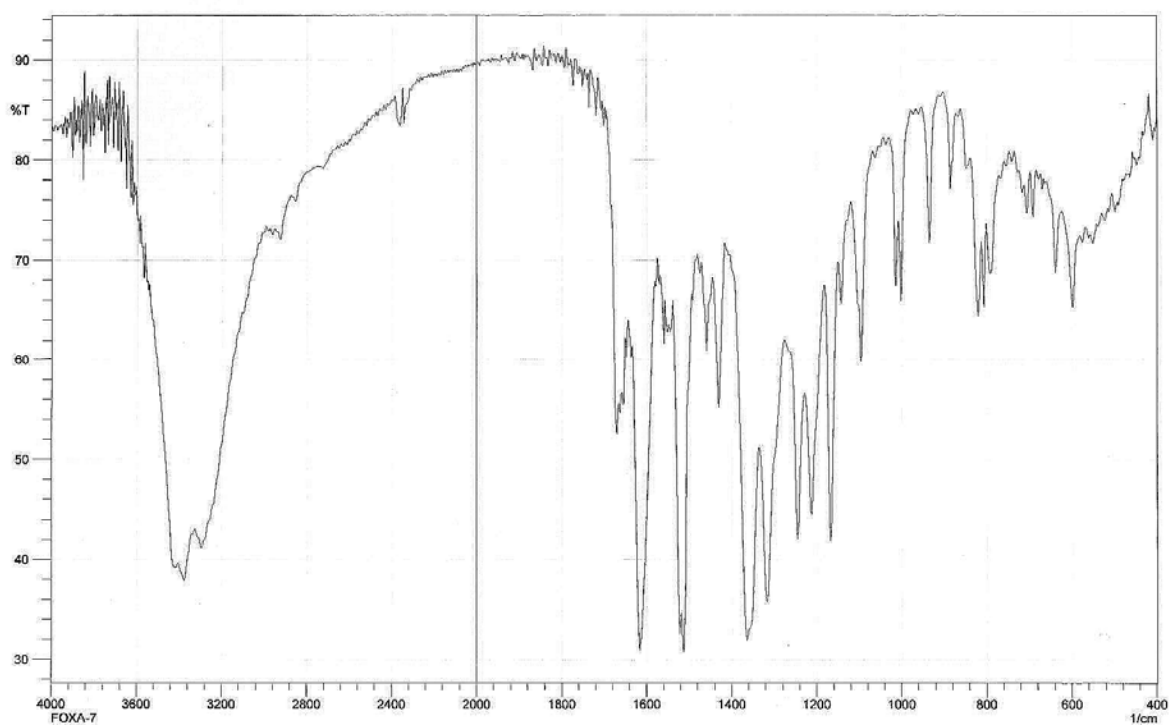
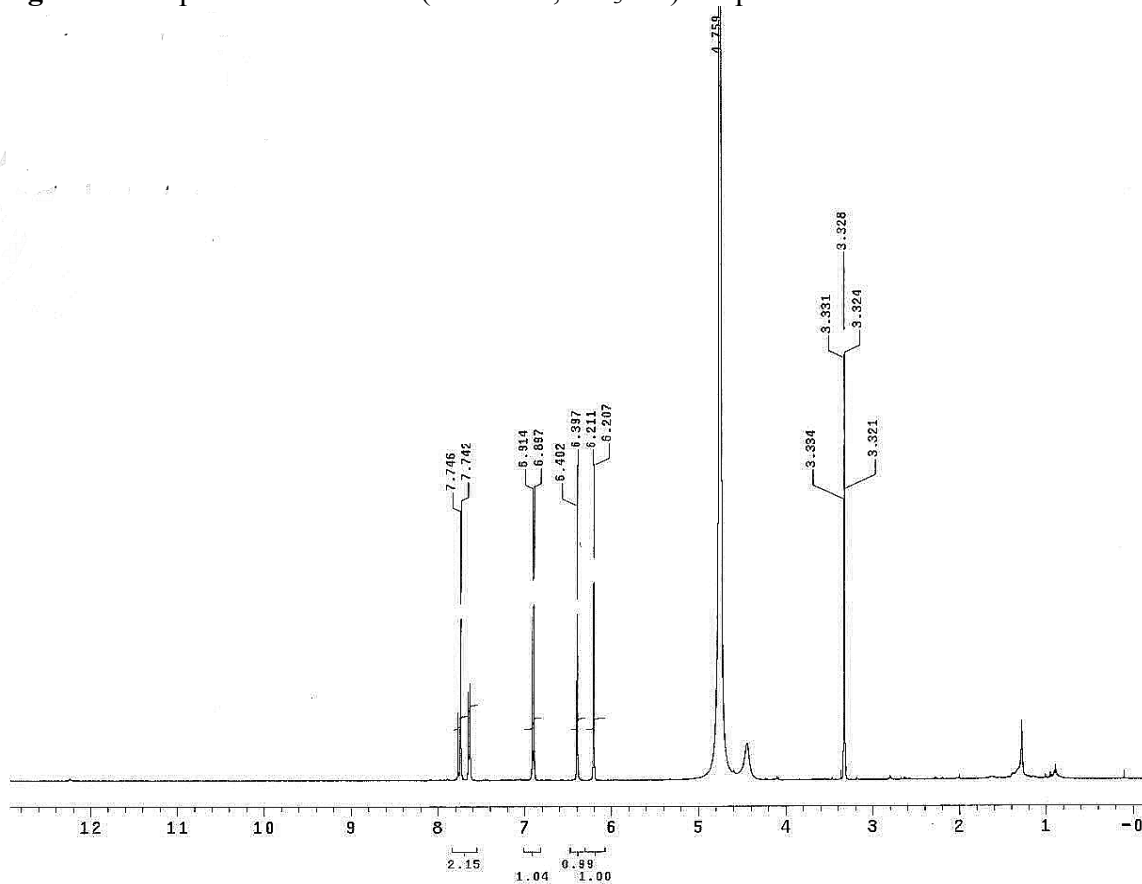


Figura 32. Espectro de RMN¹H (500 MHz, CD₃OD) da quercetina



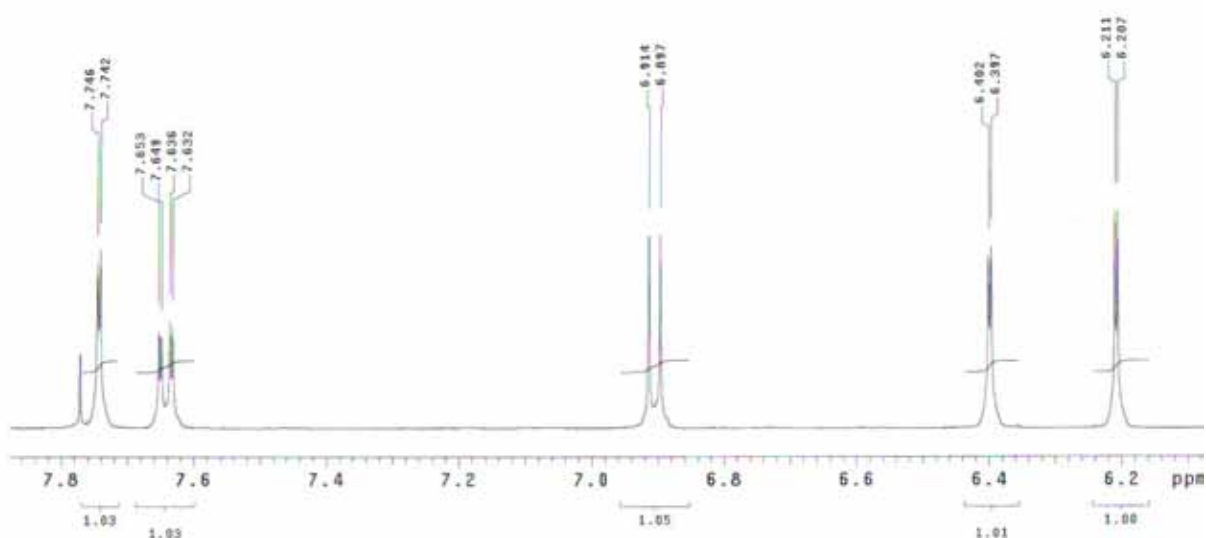


Figura 33. Espectro de RMN¹³C (125 MHz, CD₃OD) da quercetina

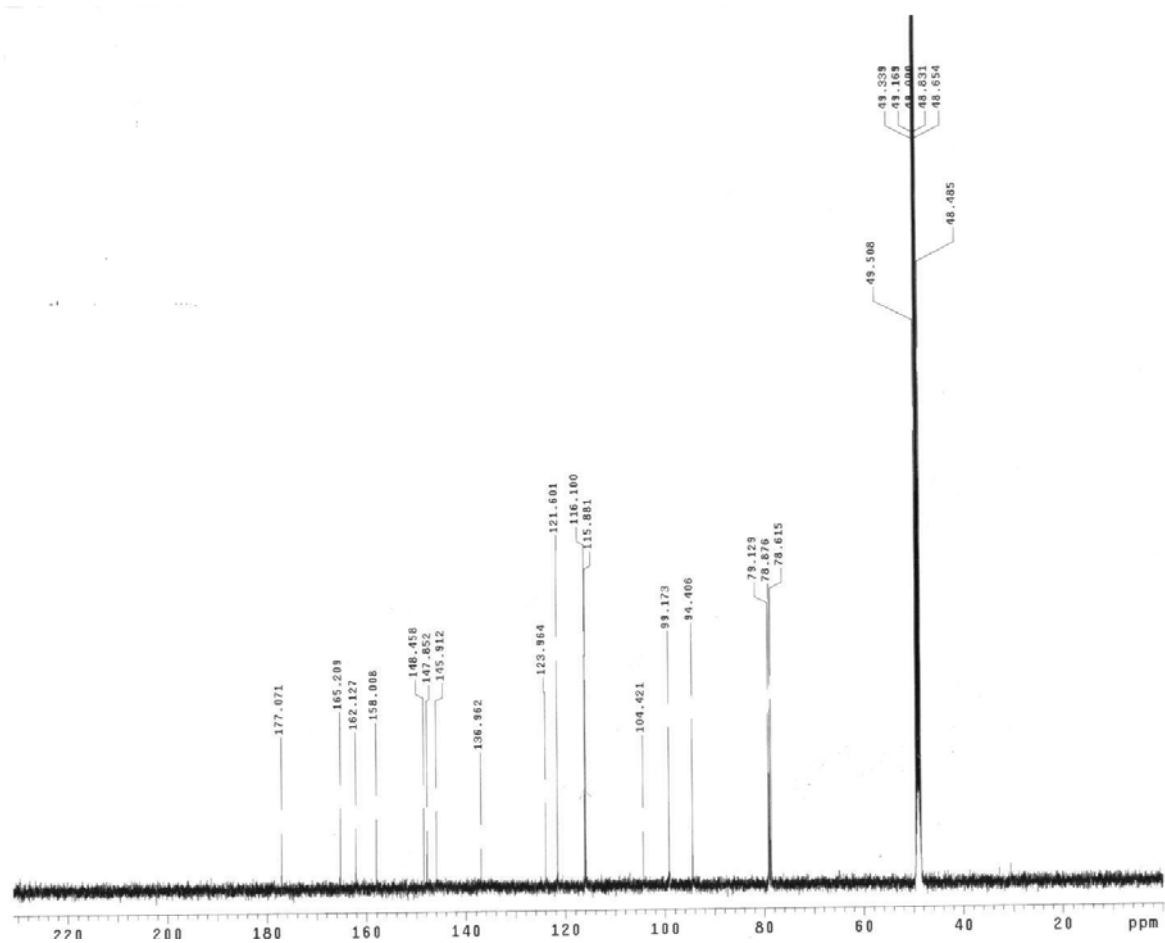


Figura 34. Espectro de DEPT 135° (125 MHz, CD₃OD) da quercetina

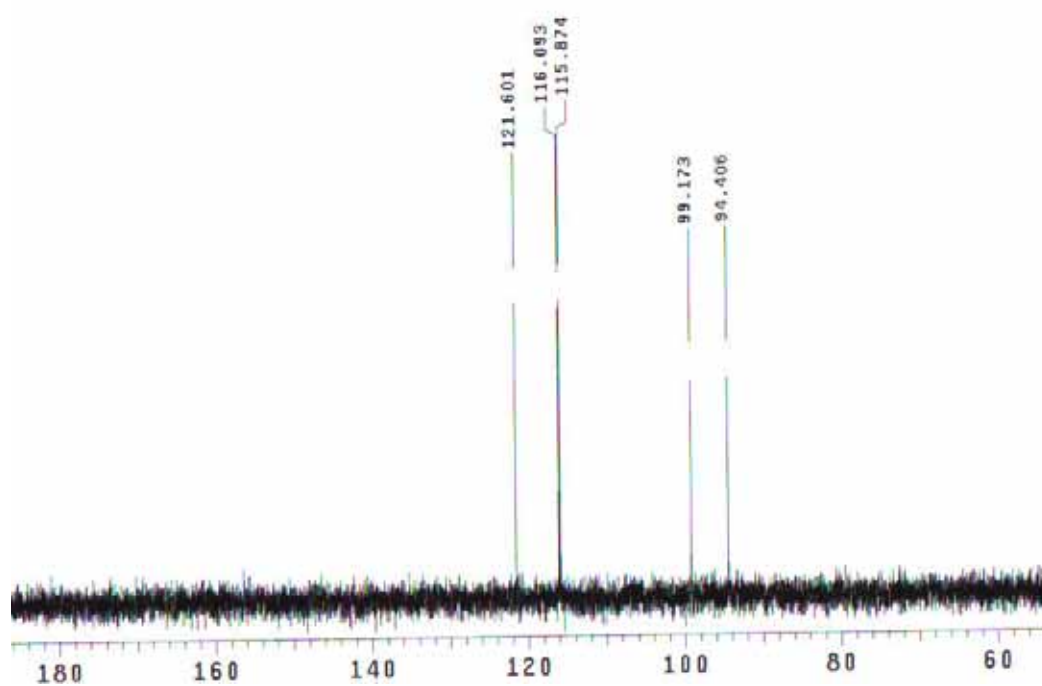


Figura 35. Espectro de COSY (¹H: 500 MHz, CD₃OD) da quercetina

