



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**  
Centro Biomédico  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Graziela da Silva Mello

**Avaliação do potencial antimalárico de *Norantea brasiliensis* Choisy  
(Marcgraviaceae) cultivada *in vitro* e *in vivo***

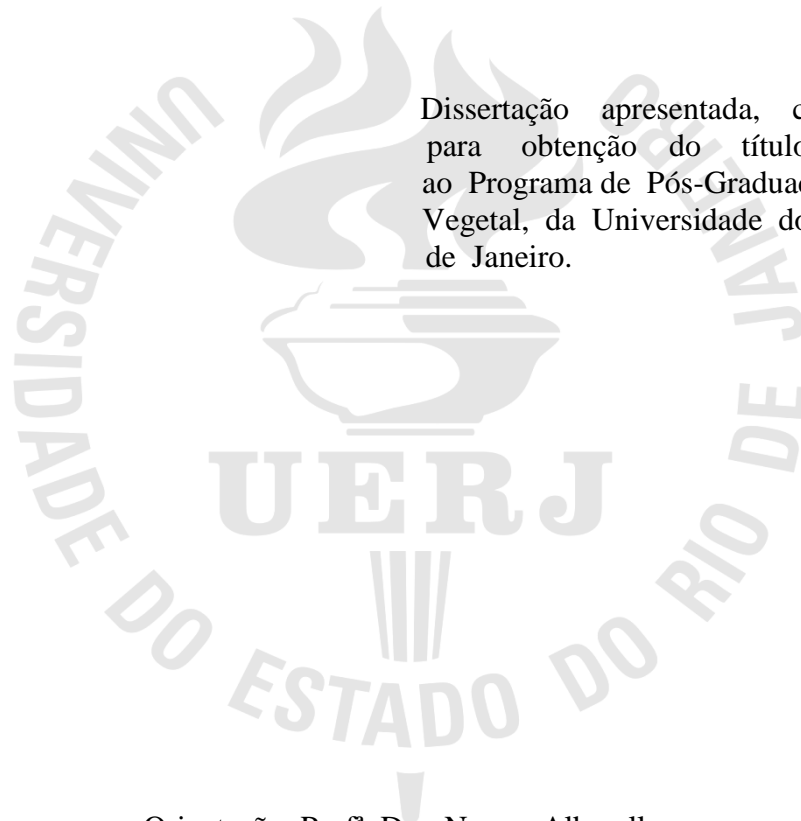
Rio de Janeiro

2012

Graziela da Silva Mello

**Avaliação do potencial antimalárico de *Norantea brasiliensis* Choisy (Mecgraviaceae)  
cultivada *in vitro* e *in vivo***

Dissertação apresentada, como requisito para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.



Orientação: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Norma Albarello

Coorientação: Prof. Dr. Valber da Silva Frutuoso

Rio de Janeiro

2012

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CTC-A

M527

Mello, Graziela da Silva.  
Avaliação do potencial antimalárico de *Norantea brasiliensis* Choisy (MARCGRAVIACEAE) cultivada in vitro e in vivo / Graziela da Silva Mello. – 2012.  
89f : il.

Orientadora: Norma Albarello  
Coorientador: Valber da Silva Frutuoso.  
Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes.  
Inclui bibliografia.

1. Marcgraviaceae - Cultivo – Teses. 2. Antimaláricos - Teses.  
3. Malária – Teses. 4. Fertilização in vitro – Teses. I. Albarello, Norma. II. Frutuoso, Valber da Silva. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 582:616.936

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação.

---

Assinatura

---

Data

Graziela da Silva Mello

**Avaliação do potencial antimalárico de *Norantea brasiliensis* Choisy (Marcgraviaceae)  
cultivada *in vitro* e *in vivo***

Dissertação apresentada, como requisito para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 28 de fevereiro de 2012.

Banca examinadora:

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Norma Albarello (Orientadora)  
Departamento de Biologia Vegetal da UERJ

---

Prof<sup>a</sup>. Dra.. Andrea Furtado Macedo  
Departamento de Botânica da UNIRIO

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Claudia Simões  
Departamento de Biologia Vegetal da UERJ

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Silvia Amaral Gonçalves da Silva  
Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da UERJ

Rio de Janeiro

2012

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho aos meus pais, Isaias e Dircilene.

## AGRADECIMENTOS

À professora Dra. Norma Albarello, Coordenadora do Laboratório de Biotecnologia de Plantas (LABPLAN), do Departamento de Biologia Vegetal (DBV), Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (IBRAG) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, pela orientação, ensinamentos, incentivo e paciência ao longo do desenvolvimento desse trabalho.

Ao professor Dr. Valber Frutuoso, do Laboratório de Imunofarmacologia, do Departamento de Fisiologia e Farmacodinâmica, do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), pela co-orientação e por ter franqueado o acesso aos laboratórios da FIOCRUZ.

À Dra. Mônica Farah, do Laboratório de Imunofarmacologia, do Departamento de Fisiologia e Farmacodinâmica, do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), pelo auxílio nos experimentos do potencial antimalárico e na parte escrita deste trabalho.

À pesquisadora Dra. Ana Claudia Fernandes Amaral e os alunos do Laboratório de Produtos Naturais 1, do Instituto de Tecnologia em Fármacos (Far-Manguinhos), da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) pelo auxílio técnico nas análises cromatográficas.

À Universidade do Estado do Rio de Janeiro e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, pela oportunidade de realização do curso e deste trabalho.

Aos companheiros do LABPLAN pelo auxílio e apoio técnico.

À graduanda Anna Flávia Villardo, pelo auxílio nos experimentos de cultivo vegetal *in vitro* e pelos momentos de diversão.

Aos meus pais, Isaias e Dircilene, por estarem sempre ao meu lado, me apoiando e incentivando em todas as decisões. Obrigada pelo amor.

Aos meus irmãos, Grazione e Gabriela, e familiares pelos momentos de carinho e solidariedade.

Ao meu amigo, Marcelo Elias Turler, pela grande ajuda na parte estatística do trabalho.

Às minhas amigas Ana Olívia Reis e Maryna Py, obrigada pela compreensão, pelos conselhos e encorajamento.

Ao Ronaldo Belarmino, pela paciência, carinho, amor e momentos felizes que me proporcionou.

Aos meus amigos, pelos momentos que compartilhamos durante todos os anos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela bolsa concedida e pelo apoio financeiro ao projeto “Desenvolvimento de novas opções terapêuticas para malária busca racional de novos agentes antimaláricos na flora brasileira”, Rede Pronex Malária, onde o presente estudo está inserido.

Quanto mais nos elevamos, menores parecemos aos olhos daqueles que não sabem voar.

*Friedrich Nietzsche*



## RESUMO

MELLO, Graziela da Silva. *Avaliação do potencial antimalárico de Norantea brasiliensis Choisy (Marcgraviaceae) cultivada in vitro e in vivo*. 2012. 89 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

A malária é uma doença infecciosa causada por protozoários do gênero *Plasmodium*, transmitidos ao homem, principalmente, através da picada do mosquito infectado. O tratamento é realizado por meio do uso de drogas, como a cloroquina, uma vez que não há vacina eficiente contra a doença. Porém, a resistência dos parasitos aos medicamentos tem levado à busca por novas substâncias com atividade antimalárica, inclusive de origem vegetal. Nesse contexto, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a atividade antimalárica de extratos metanólicos de *Norantea brasiliensis* cultivada sob condições *in vivo* e *in vitro*, espécie nativa ocorrente em restingas, com potencial medicinal já comprovado para várias atividades. Foram desenvolvidos protocolos de calogênese e cultura de raízes da espécie visando à definição de um sistema de produção de metabólitos. Para a cultura *in vitro*, explantes foram inoculados em meio líquido e sólido contendo diferentes fitorreguladores e concentrações. A partir da cultura de tecidos, foram testados extratos do material produzido biotecnologicamente para comparação com o material botânico cultivado no campo. Os testes sobre o potencial antimalárico foram realizados *in vivo*, utilizando-se camundongos infectados pelo *Plasmodium berghei* ANKA, e *in vitro* utilizando o *Plasmodium falciparum*. Em seguida foram administrados a cloroquina e os extratos vegetais. A parasitemia foi observada seguindo os protocolos já estabelecidos pelo Laboratório de Imunofarmacologia do Instituto Oswaldo Cruz (IOC). Resultados mostraram que explantes foliares e caulinares de plantas germinadas *in vitro*, inoculados em meio sólido B5 suplementado com 2,0 mg.mL<sup>-1</sup> de ANA, são as melhores fontes para a produção de raízes, apresentando maiores valores de peso fresco e peso seco, mostrando-se um sistema promissor para a produção *in vitro* de metabólitos da espécie. A avaliação da atividade antimalárica *in vivo* revelou seu potencial a partir de extrato de raízes de planta cultivada *in vivo*, na concentração de 50 mg/kg apresentando redução significativa da parasitemia quando comparada com o controle não tratado. Paralelamente, nos testes *in vitro* a concentração de 100 µg/kg do extrato de raízes de planta cultivada *in vivo* apresentou diferença significativa quando comparada com as outras concentrações testadas e o controle negativo. Além disso, há uma tendência de aumento do efeito inibitório conforme o aumento da concentração do extrato. Os resultados indicam o potencial de atividade antimalárica em raízes de *N. brasiliensis*, sendo este estudo o primeiro realizado para a espécie.

Palavras-chave: Planta medicinal. *N. brasiliensis*. Cultura *in vitro* de raízes. Atividade antimalárica

## ABSTRACT

Malaria is an infectious disease caused by protozoa of the genus *Plasmodium*, transmitted to humans primarily through the bite of an infected mosquito. The treatment is accomplished through the use of drugs such as chloroquine, since there is no effective vaccine against the disease. However, the resistance of parasites to drugs has led to the search for new antimalarial substances, including vegetable. In this context, this study aimed to evaluate the antimalarial activity of methanol extracts of *Norantea brasiliensis* grown under conditions *in vivo* and *in vitro*, native species occurring in salt marshes, with proven medicinal potential for various activities. Protocols were developed callus and culture of roots of species in order to define a system for production of metabolites. For *in vitro* culture, explants were inoculated in liquid and solid media containing different growth regulators and concentrations. From the tissue culture material were tested extracts biotechnologically produced for comparison with plant material grown in the field. Tests on the potential *in vivo* antimalarial were performed using mice were infected by *Plasmodium berghei* ANKA, and *in vitro* using the *Plasmodium falciparum*. They were then administered chloroquine and plant extracts. The parasitemia was observed following the protocols established by the Laboratory of Immunopharmacology of the Oswaldo Cruz Institute (IOC). Results showed that stem and leaf explants of *in vitro* germinated seedlings were inoculated on B5 solid medium supplemented with  $2.0 \text{ mg.mL}^{-1}$  ANA, are the best sources for the production of roots, with highest values of fresh weight and dry weight and proved to be a promising system for *in vitro* production of metabolites of the species. The assessment of antimalarial activity *in vivo* has shown its potential to extract from plant roots grown *in vivo* at a concentration of 50 mg/kg showing significant reduction of parasitemia when compared with the untreated control. Similarly, in *in vitro* tests the concentration of 100  $\mu\text{g/kg}$  of extract of roots of plants grown *in vivo* showed a significant difference when compared with other tested concentrations and negative control. Furthermore, there is a tendency to increase the inhibitory effect with increasing extract concentration. The results indicate the potential for antimalarial activity in roots of *N. brasiliensis*, which is the first study conducted for the species.

Keywords: Plant medicinal. *N.brasiliensis*. *In vitro* roots culture. Antimalarial activity.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição geográfica da malária no mundo .....	18
Figura 2 - Regiões e risco da transmissão de malária no Brasil em 1999 e em 2008 .....	19
Figura 3 - Habitus arbustivo de <i>Norantea brasiliensis</i> .....	26
Figura 4 - Detalhe da inflorescência de <i>Norantea brasiliensis</i> exibindo nectários .....	26
Figura 5 - Espectro de absorção das amostras de substância pigmentada produzida nas culturas de raízes e calogênese .....	38
Figura 6 - Cultura <i>in vitro</i> de <i>N. brasiliensis</i> .....	39
Figura 7 - Desenvolvimento de raízes de <i>N. brasiliensis</i> a partir dos explantes caulinar e foliar, inoculados em meio B5 sólido suplementado com 3,0 mg.L <sup>-1</sup> de KIN associado a 0,5 mg.L <sup>-1</sup> de ANA após três meses de cultivo.....	40
Figura 8 - Produção de carotenoides inibindo a resposta morfogênica em explantes caulinares inoculados em meio sólido suplementado com 1,0 mg.L <sup>-1</sup> de ANA .....	40
Figura 9 - Cultura <i>in vitro</i> de raízes de <i>N. brasiliensis</i> propagada a partir de explante radicular em meio B5 líquido suplementado com 2,0 mg.L <sup>-1</sup> de AIA, ao final de seis semanas de cultivo.....	41
Figura 10 - Resposta morfogênica de explantes foliares de plantas de <i>N. brasiliensis</i> propagadas <i>in vitro</i> , cultivados em meio B5 sólido suplementado com diferentes fitorreguladores, ao final de seis semanas de cultivo.....	44
Figura 11 - Resposta morfogênica de explantes caulinares em meio sólido oriundos de plantas de <i>N. brasiliensis</i> propagadas <i>in vitro</i> , após três meses de cultivo .....	47
Figura 12 - Desenvolvimento de brotos axilares e produção de raízes (seta) a partir de explantes caulinares de <i>Norantea brasiliensis</i> propagada <i>in vitro</i> , inoculados em meio B5 líquido suplementado com 2,0 mg.L <sup>-1</sup> de AIA, após seis semanas de cultivo .....	48

Figura 13 - Explantes radiculares de plantas de <i>N. brasiliensis</i> germinadas <i>in vitro</i> , cultivados em meio B5, ao final de quatro semanas de cultivo .....	50
Figura 14 - Resposta morfogênica de explantes radiculares de <i>N. brasiliensis</i> germinadas <i>in vitro</i> , cultivados em meio B5 suplementado com 1,0 mg.L <sup>-1</sup> de AIB, ao final de seis semanas de cultivo.....	51
Figura 15 - Resposta morfogênica de explantes radiculares de plantas de <i>N. brasiliensis</i> obtidas por germinação <i>in vitro</i> , cultivados em meio B5, ao final de seis semanas de cultivo.....	52
Figura 16 - Resposta morfogênica de explantes foliares de plantas de <i>N. brasiliensis</i> obtidas por germinação <i>in vitro</i> , cultivados em meio B5 sólido contendo diferentes auxinas, ao final de seis semanas de cultivo .....	54
Figura 17 - Resposta morfogênica de explantes caulinares de plantas de <i>N. brasiliensis</i> obtidas por germinação <i>in vitro</i> , cultivados em meio B5 líquido suplementado com diferentes fitorreguladores, ao final de seis semanas de cultivo .....	56
Figura 18 - Resposta morfogênica de explantes foliares de plantas de <i>N. brasiliensis</i> obtidas por germinação <i>in vitro</i> , cultivados em meio B5 sólido suplementado com diferentes auxinas, ao final de seis semanas de cultivo .....	57
Figura 19 - Parasitemia média em camundongos infectados pelo <i>Plasmodium berghei</i> (ANKA) .....	59
Figura 20 - Sobrevida dos animais tratados com extrato metanólico obtido a partir de raízes de <i>N. brasiliensis</i> cultivada <i>in vivo</i> , durante 15 dias após a infecção com <i>P. berghei</i> ANKA. Gráfico representativo de um experimento independente .....	60
Figura 21 - Parasitemia média em camundongos infectados pelo <i>Plasmodium berghei</i> (ANKA) .....	61
Figura 22 - Sobrevida dos animais tratados com extrato metanólico obtido a partir de folhas de <i>N. brasiliensis</i> cultivada <i>in vivo</i> , durante 15 dias após a infecção com <i>P. berghei</i> ANKA. Gráfico representativo de um experimento independente .....	61
Figura 23 - Parasitemia média em camundongos infectados pelo <i>Plasmodium berghei</i> (ANKA) .....	62

Figura 24 - Sobrevida dos animais tratados com extrato metanólico obtido a partir de caules de <i>N. brasiliensis</i> cultivada <i>in vivo</i> , durante 15 dias após a infecção com <i>P. berghei</i> ANKA. Gráfico representativo de um experimento independente .....	63
Figura 25 - Parasitemia média em camundongos infectados pelo <i>Plasmodium berghei</i> (ANKA) .....	64
Figura 26 - Sobrevida dos animais tratados com extrato metanólico obtido a partir de raízes de <i>N. brasiliensis</i> cultivada <i>in vitro</i> , durante 15 dias após a infecção com <i>P. berghei</i> ANKA. Gráfico representativo de um experimento independente .....	65
Figura 27 - Fluorescência relativa correspondente a proliferação de <i>Plasmodium falciparum</i> (cepa Haiti HUCFF) incubados com extrato metanólico obtido a partir de folhas de <i>N. brasiliensis</i> cultivada <i>in vivo</i> .....	66
Figura 28 - Fluorescência relativa correspondente a proliferação de <i>Plasmodium falciparum</i> (cepa Haiti HUCFF) incubados com extrato metanólico obtido a partir de raízes de <i>N. brasiliensis</i> cultivada <i>in vivo</i> .....	67
Figura 29 - Fluorescência relativa correspondente a proliferação de <i>Plasmodium falciparum</i> (cepa Haiti HUCFF) incubados com extrato metanólico obtido a partir de caules de <i>N. brasiliensis</i> cultivada <i>in vivo</i> .....	68
Figura 30 - Cromatograma obtido por CLAE/DAD, a partir de extrato metanólico bruto de folhas de <i>N.brasiliensis</i> (a) e espectro de absorção na região do ultravioleta (b) ..	70
Figura 31 - Cromatograma obtido por CLAE/DAD, a partir de extrato metanólico bruto de Raízes de <i>N.brasiliensis</i> (a) e espectro de absorção na região do ultravioleta (b) ..	71
Figura 32 - Cromatograma obtido por CLAE/DAD, a partir de extrato metanólico bruto de caules de <i>N.brasiliensis</i> (a) e espectro de absorção na região do ultravioleta (b) ..	72

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Data de introdução e primeiros casos de registro de resistência de <i>P. falciparum</i> aos antimaláricos mais utilizados .....	21
Tabela 2 - Composição dos meios de cultura utilizados na indução de calogênese de <i>N. brasiliensis</i> a partir de explantes caulinares, foliares e radiculares .....	30
Tabela 3 - Composição dos meios de cultura utilizados na indução da cultura de raízes de <i>N. brasiliensis</i> a partir de explantes radiculares, caulinares e foliares .....	31
Tabela 4 - Avaliação dos pesos de matéria fresca e seca de raízes obtidas a partir de explantes radiculares de plantas de <i>Norantea brasiliensis</i> propagadas <i>in vitro</i> e cultivado em meio B5 suplementado com diferentes fitorreguladores, após seis semanas de cultivo .....	43
Tabela 5 - Avaliação dos pesos de matéria fresca e seca de raízes obtidas a partir de explantes foliares de plantas de <i>Norantea brasiliensis</i> propagada <i>in vitro</i> e cultivados em meio B5 suplementado com diferentes fitorreguladores, após seis semanas de cultivo .....	46
Tabela 6 - Avaliação dos pesos de matéria fresca e seca de raízes obtidas a partir de explantes caulinares de plantas de <i>Norantea brasiliensis</i> propagada <i>in vitro</i> e cultivado em meio B5 suplementado com diferentes fitorreguladores, após seis semanas de cultivo .....	49
Tabela 7 - Avaliação dos pesos de matéria fresca e seca de raízes obtidas a partir de explantes radiculares de plantas de <i>Norantea brasiliensis</i> obtidas por germinação <i>in vitro</i> , cultivado em meio B5 suplementado com diferentes fitorreguladores, após seis semanas de cultivo .....	53
Tabela 8 - Avaliação dos pesos de matéria fresca e seca de raízes obtidas a partir de explantes foliares de plantas de <i>Norantea brasiliensis</i> obtidas por germinação <i>in vitro</i> , cultivados em meio B5 suplementado com diferentes fitorreguladores, após seis semanas de cultivo .....	55
Tabela 9 - Avaliação dos pesos de matéria fresca e seca de raízes obtidas a partir de explantes caulinares de plantas de <i>Norantea brasiliensis</i> obtidas por germinação <i>in vitro</i> ,	

cultivados em meio B5 suplementado com diferentes fitorreguladores, após seis semanas de cultivo ..... 58

Tabela 10 - Valores de concentração letal (CL<sub>50</sub>) de extratos metanólicos de *Norantea brasiliensis* cultivada *in vivo* e *in vitro*, determinado por teste de letalidade em *Artemia salina* ..... 69

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AIA	Ácido indolacético
AIB	Ácido indolbutírico
ANA	Ácido 1-naftaleno acético
B5	Meio de cultura GAMBORG (1968)
BAP	6-benzilaminopurina
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DMSO	Dimetilsulfóxido
KIN	Cinetina (6-furfurilaminopurina)
PF	Peso fresco
PIC	Ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico
PS	Peso seco
RFU	Unidade relativa de fluorescência



## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	17
1	<b>OBJETIVOS</b> .....	27
1.1	<b>Geral</b> .....	27
1.2	<b>Específicos</b> .....	27
2	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	28
2.1	<b>Material botânico</b> .....	28
2.1.1	<u>Material vegetal <i>in vivo</i></u> .....	28
2.1.2	<u>Material vegetal <i>in vitro</i></u> .....	28
2.2	<b>Identificação da substância pigmentada</b> .....	31
2.3	<b>Análise microbiológica da substância pigmentada</b> .....	32
2.4	<b>Preparo dos extratos vegetais</b> .....	32
2.5	<b>Teste para detecção de atividade antimalárica</b> .....	32
2.6	<b>Teste de citotoxicidade</b> .....	36
2.7	<b>Análise estatística</b> .....	37
2.8	<b>Perfil fitoquímico</b> .....	37
3	<b>RESULTADOS</b> .....	38
4	<b>DISCUSSÃO</b> .....	73
5	<b>CONCLUSÕES</b> .....	81
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	82

## INTRODUÇÃO

### **Malária: um problema mundial da saúde pública**

A malária, popularmente conhecida como maleita ou paludismo, é uma das principais doenças infecciosas do mundo, matando anualmente duas vezes mais que a AIDS (do inglês *Acquired Immunodeficiency Syndrome*), segundo CAMARGO (2003). De acordo com dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), anualmente cerca de 500 milhões de novos casos ocorrem em todo o globo, em mais de 90 países, pondo em risco 40% da população mundial, causando alto impacto econômico e elevada morbidade (MURPHY et al., 2001; MARIATH et al., 2009).

Endêmica principalmente em regiões tropicais e subtropicais que apresentam os maiores índices de infecção, esta enfermidade parasitária é tipicamente classificada como uma doença do mundo subdesenvolvido, pois acarreta problemas socioambientais contribuindo para um menor desenvolvimento dos países afetados (CARRILLO-ROSARIO et al., 2005).

Estimativas recentes mostram que 80% dos casos clínicos de malária no mundo restringem-se ao continente africano (HAY et al., 2004). Desses casos, 75% ocasionam óbitos de crianças, o que estatisticamente quer dizer que uma criança morre a cada 30 segundos (WONGSRICHANALAI et al., 2002). Os demais 20% dos casos estão distribuídos entre o Sudoeste Asiático, a América Latina e a Oceania (Figura 1).

Em 1998, uma parceria entre a OMS, o Fundo das Nações Unidas para a Infância, o Programa de Desenvolvimento das Nações Unidas (UNDP) e o Banco Mundial, permitiu a criação de um programa global de combate e erradicação da malária, conhecido como *Roll Back Malaria* (RBM). Atualmente, o programa conta com mais de 500 parceiros, incluindo países endêmicos, instituições acadêmicas e de pesquisa, e tem como um de seus objetivos que até 2015 a doença não seja mais uma das principais causas de mortalidade e obstáculo ao desenvolvimento econômico e social em todo o mundo (RBM, 2010).

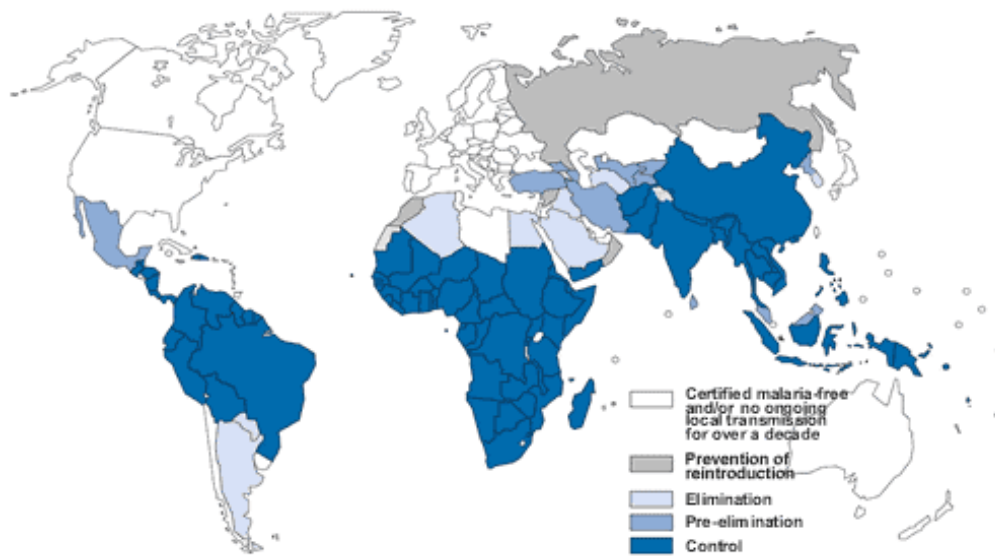


Figura 1 - Distribuição geográfica da malária no mundo. Fonte: OMS, 2009.

Legenda:		Áreas livres da malária e/ou ausência de transmissão por mais de uma década
		Prevenção da reintrodução
		Eliminação
		Pré-eliminação
		Controle

### A malária no Brasil

No Brasil, os primeiros relatos de malária datam do século XVI, indicando o seu surgimento como consequência da colonização Europeia. A primeira grande epidemia de malária no país ocorreu na região amazônica, no final do século XIX e aconteceu concomitantemente com a migração maciça de indivíduos, vindos principalmente da região Nordeste, que foram em busca de trabalho na extração de látex na Amazônia, conhecida com “Império da borracha” (COURA et al., 2006). Ainda em função da exploração da borracha, com a construção da Estrada de Ferro Madeira-Mamoré para dar vazão ao látex boliviano, ocorreu a segunda grande epidemia amazônica de malária (CAMARGO, 2003).

No início do século XX, a malária estava presente em todas as capitais brasileiras, sendo endêmica no país e, somente após a Segunda Guerra Mundial, a doença se concentrou na Amazônia (CAMARGO, 2003). Atualmente, a Região Amazônica é a que registra a maior incidência da doença (Figura 2), com cerca de 100% dos casos, e este fato se deve, principalmente, às condições ambientais e socioculturais que favorecem a expansão de sua transmissão (Ministério da saúde, 2008).

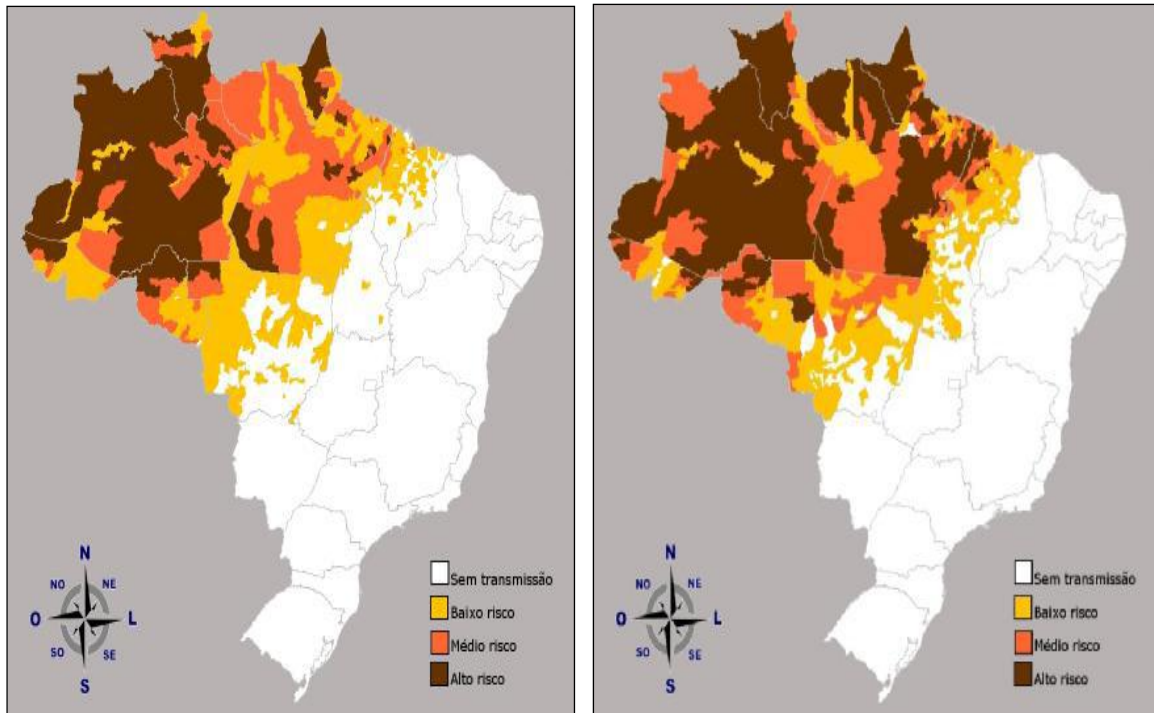


Figura 2 - Regiões e risco da transmissão de malária no Brasil em 1999 (esquerda) e em 2008 (direita). Fonte: Ministério da Saúde, 2008.

Em 2003, 407.691 casos da doença foram notificados na Amazônia Legal, divisão política do território nacional que engloba nove estados: Amazônia, Acre, Amapá, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins. Destacaram-se os estados do Amazonas, Rondônia e Pará, responsáveis por cerca de 50% da totalidade das ocorrências, com uma incidência parasitária anual, respectivamente, de 46,3/1.000 habitantes, 64,4/1.000 habitantes e 17,6/1.000 habitantes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

Com a finalidade de reduzir e eliminar o risco de adoecer ou morrer de malária, desde 1993, por recomendação da Conferência Ministerial de Amsterdã, o Brasil faz uso da Estratégia Global de Controle Integrado da Malária, uma ação entre o governo e a sociedade, que tem por objetivo diminuir a mortalidade e reduzir as perdas sociais e econômicas provocadas pela doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

### O agente etiológico e seus vetores

Os parasitos da malária são protozoários que pertencem à família Plasmodiidae e ao gênero *Plasmodium* (CONSOLI & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). Atualmente são conhecidas quatro espécies que parasitam o homem: *Plasmodium vivax*, *P. falciparum*, *P.*

*ovale* e *P. malariae*, os quais se diferem em relação à morfologia e aspectos imunobiológicos, além de sua distribuição geográfica e suas respostas às drogas (SNOW et al., 2004).

O *Plasmodium vivax* é responsável pelo maior número de registros da doença, e tem sido destacado como o responsável por cerca de 300 milhões de novos casos por ano, onde 70% dos casos se concentram na América Central e América do Sul, incluindo o Brasil (MENDIS et al., 2001; PRICE et al., 2007). Entretanto, *P. falciparum* é o mais letal, tendo como peculiaridade infecções graves, podendo inúmeras vezes evoluir para a malária cerebral, onde o parasito pode comprometer progressivamente o sistema nervoso (FRANÇA et al., 2008), sendo geralmente fatal em crianças e jovens (MARIATH et al.; 2009).

A transmissão do *Plasmodium* causador da malária se dá, principalmente, através da picada da fêmea, do mosquito infectado, do gênero *Anopheles* (VERONESI, 1991). Entretanto, pode ser transmitido acidentalmente por transfusão de sangue (sangue contaminado com o plasmódio), pelo compartilhamento de seringas, havendo ainda a possibilidade de transmissão neonatal.

Existem cerca de 400 espécies de *Anopheles* no mundo, dos quais 60 são vetores da malária sob condições naturais, sendo 30 de grande importância epidemiológica (SNOW et al., 2004; AMINO et al., 2006). No Brasil, os principais transmissores da malária são classificados em: *Anopheles darlingi*, *A. aquasalis*, *A. albitarsis*, *A. cruzi* e *A. bellator*, merecendo destaque para *A. darlingi* que é o único anofelino brasileiro no qual foram detectadas infecções naturais pelas três espécies que causam a malária humana nas Américas: *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

### **Manifestações clínicas, tratamento e resistência**

A doença se caracteriza por apresentar uma fase inicial composta por febre alta, dores de cabeça, calafrios e sudorese, que ocorrem em padrões cíclicos, de acordo com a espécie do plasmódio (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008). Após essa fase inicial, febres intermitentes são características e dependentes dos ciclos eritrocíticos de cada espécie de plasmódio: 48 horas para o *Plasmodium falciparum* e *P. vivax* (malária terçã) e 72 horas para *P. malariae* (malária quartã), entretanto essa regularidade é pouco comum atualmente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

O tratamento da malária é complexo, longo e muitas vezes ineficaz devido à reinfeção do paciente, muito comum em regiões endêmicas da doença (FRANÇA et al., 2008). Além disso, a falta de uma vacina eficaz, a ineficiência no controle dos vetores, o desinteresse das indústrias farmacêuticas em desenvolver fármacos baratos e acessíveis e a falta de programas de educação nas regiões de risco são apenas alguns dos problemas enfrentados para que a malária deixe de ser uma questão de saúde pública mundial (OMS, 2009).

Outro aspecto relevante é que as espécies de protozoários foram desenvolvendo resistência às drogas usadas devido, principalmente, ao uso indiscriminado dos antimaláricos, como a cloroquina (GOLENSER et al., 2006). Ainda nesse contexto, a utilização de um único fármaco no tratamento ocasiona uma seleção e espalhamento de parasitas mutantes resistentes enquanto que o uso de múltiplos fármacos, em longo prazo, leva ao aparecimento de cepas de parasitas multi-resistentes (FRANÇA et al., 2008). Sabe-se, por exemplo, que o *P. falciparum* é resistente à cloroquina, sulfadoxina-pirimetamina, quinino e outros derivados (Tabela 1) (WONGSRICHANALAI et al., 2002; FERNANDES et al., 2007).

Tabela 1 - Data de introdução e primeiros registros de resistência de *P. falciparum* aos antimaláricos mais utilizados.

<b>Fármaco</b>	<b>Introduzido em</b>	<b>Primeiro registro de resistência</b>	<b>Diferença (anos)</b>
Quinino	1632	1910	278
Cloroquina	1945	1957	12
Proguanil	1948	1949	1
Sulfadoxina-pirimetamina	1967	1967	0
Mefloquina	1977	1982	5
Atovaquona	1996	1996	0
Artemisinina e derivados	1980	-	-

Fonte: Adaptado de WONGSRICHANALAI e colaboradores (2002).

Este fato tem levado a comunidade científica a buscar novas substâncias bioativas com atividade antimalárica, onde a pesquisa com matéria-prima vegetal ganha cada vez mais espaço.

### **Plantas como fonte de substâncias medicinais**

O uso de plantas medicinais é registrado desde 2.600 A.C., na região da Mesopotâmia (GURIB-FAKIM, 2006), e até hoje as plantas têm sido consideradas importante fonte terapêutica usada por populações de todo o mundo com o intuito de tratar e curar diversas enfermidades. Geralmente considerados como alternativa ou forma complementar aos medicamentos sintéticos (SOUSA et al., 2008), o uso de produtos naturais à base de plantas surgiu principalmente devido à crença de que os fitoterápicos são isentos de efeitos colaterais ou os apresentam de forma reduzida; além disso, os medicamentos sintéticos geralmente são caros, não sendo acessíveis a todas as pessoas. Atualmente, estima-se que entre 65 a 80 % da população mundial faz uso de plantas medicinais (AGRA, 2008).

No que diz respeito ao setor econômico, os fitoterápicos apresentam uma parcela significativa no mercado de medicamentos. Movimenta globalmente cerca de US\$ 21,7 bilhões por ano, sendo que no Brasil não existem dados oficiais atualizados, mas estima-se que o mercado gira em torno de US\$ 160 milhões por ano. O fator de atração é tão grande que o ritmo de crescimento das vendas internamente é de mais de 15% anuais, contra apenas 4% do que evoluem as vendas dos medicamentos sintéticos (CARVALHO et al., 2008).

Sabe-se que, em relação a espécies tropicais, apenas 1% teve seu potencial medicinal investigado, sendo essas espécies vegetais considerado um verdadeiro depósito de moléculas bioativas (GURIB-FAKIM, 2006; JACHAK & SAKLANI, 2007). Tais moléculas, conhecidas como metabólitos secundários ou especiais, desenvolvem diversos papéis na proteção e adaptação da planta ao ambiente, sendo consideradas essenciais à sobrevivência de muitos vegetais, e com importantes atividades que justificam sua pesquisa e uso no tratamento e cura de doenças (VERPOORTE et al., 2002; KARUPPUSAMY, 2009).

Em relação às plantas com atividade antimalárica, a primeira molécula a ser isolada de vegetais foi a quinina, um alcalóide aminoquinolínico, encontrado em cascas de *Cinchona sp.*, planta nativa da América do Sul. A quinina constitui uma das drogas mais antigas usadas até hoje contra a malária, e por quase três décadas foi o único princípio bioativo eficaz contra o *Plasmodium falciparum* (ANDRADE-NETO et al., 2008; BATISTA et al., 2009). Segundo

FRANÇA e colaboradores (2008) os fármacos antimaláricos são baseados em produtos naturais ou compostos sintéticos desde a década de 40.

Pesquisas recentes realizadas em roedores mostraram a diminuição da parasitemia da malária quando utilizados extratos oriundos de espécies vegetais da flora brasileira. Dentre as plantas utilizadas estão *Ampelozizyphus amazonicus* (Rhamnaceae), *Picrolemma sprucei* (Simaroubaceae), *Aspidoperma desmanthum* (Apocynaceae), *Aspidosperma vargasii* (Apocynaceae) e *Pothomorphe peltata* (Piperaceae) (ANDRADE-NETO et al., 2007; ANDRADE-NETO et al., 2008).

### **Cultura de tecidos para a produção de plantas medicinais**

A extinção de espécies vegetais tem assumido valores crescentes e se tornado um problema mundial. A drástica redução das florestas está relacionada a diversos fatores, tais como pecuária, agricultura, desmatamento e extração ilegal para fins comerciais, e mesmo considerando a extinção natural, estima-se que o homem tenha elevado a taxa de extinção de 100 a 1.000 vezes (MEDEIROS, 2003), fazendo-se necessária a adoção de políticas e ações de conservação das espécies vegetais.

Nesse sentido, a cultura de tecidos vegetais representa uma importante ferramenta biotecnológica, que aparece como alternativa aplicável à produção de plantas que podem ser utilizadas em programas de reflorestamento, bem como servir como fonte potencial na produção de plantas e substâncias às indústrias alimentícia, têxtil e farmacêutica. As crescentes descobertas na área de cultivo vegetal *in vitro* têm impulsionado as pesquisas para o uso destes recursos na produção de moléculas bioativas em grande escala e sob condições controladas (KARUPPUSAMY, 2009).

Baseada no cultivo *in vitro* de células, tecidos, protoplastos ou órgãos de espécies vegetais em condições assépticas, a cultura de tecidos abrange diversas técnicas, sendo a propagação *in vitro* ou micropropagação uma das mais utilizadas. Isso se deve ao fato de a técnica apresentar diversas vantagens, tais como, produção de plantas livres de patógenos, geneticamente uniformes, que podem ser cultivadas em pequeno espaço físico (GUERRA et al., 1999). Além disso, quando há interesse na produção de metabólitos secundários, estes podem ser produzidos *in vitro*, não havendo interferência das sazonalidades climáticas (KARUPPUSAMY, 2009).



A cultura de órgãos, é uma técnica da cultura de tecidos vegetais bastante indicada quando o metabólito de interesse é produzido em regiões ou órgãos específicos da planta, como o caso de saponinas que são produzidas apenas em raízes de *Panax ginseng* (CHOI et al., 2005; LANGHANOVÁ et al., 2005), sendo atualmente produzidas por meio de culturas *in vitro*, em escala comercial (KARAPPUSAMY, 2009).

Especialmente em relação às raízes, alguns estudos indicam que geralmente são nelas que se concentram as mais altas taxas de substâncias bioativas (YANIV & BACHRACH, 2002). Este fato pode estar associado à alta estabilidade das condições físico-químicas do órgão e à capacidade de acumular grandes quantidades de metabólitos secundários nos espaços intercelulares, que podem ser facilmente isolados (SIVAKUMAR, 2006), tornando as raízes valiosas fontes de substâncias medicinais.

O interesse por sistemas de cultura *in vitro* de raízes com a finalidade de produzir metabólitos de interesse começou a aumentar com o desenvolvimento das técnicas de cultura de raízes transformadas (*hairy roots*), onde o explante é infectado com *Agrobacterium rhizogenes* (PASQUA et al., 2005). Porém, existe também a cultura de raízes adventícias não transformadas que apresenta vantagens devido às facilidades no cultivo e a ausência de modificações genéticas da planta (MARTIN et al, 2008, SIMÕES et al., 2009).

Considerando os recursos da cultura de tecidos vegetais para a produção de substâncias de importância medicinal, torna-se relevante os estudos fitoquímicos e biotecnológicos de espécies nativas ainda pouco exploradas sob este aspecto.

### ***Norantea brasiliensis* Choisy**

*Norantea brasiliensis*, conhecida popularmente como “agarrapé”, “rabo-de-arara”, “chinelo-de-anjo”, “pente-de-macaco” (FERREIRA, 1995; ZAMITH & SCARANO, 2004), pertence à família Marcgraviaceae, que compreende cerca de cinco gêneros e 120 espécies (BARROSO, 1978). É uma espécie nativa de distribuição neotropical, sendo encontrada do nordeste ao sul do Brasil, geralmente em restingas, ambientes que vêm sofrendo com a ação antrópica, onde tem sido registrado alto índice de degradação (BARROS, 2009). Porém também é encontrada em matas litorâneas ou pluviais, bem como em regiões paludosas (FERREIRA, 1995).

A espécie é arbustiva (Figura 3) ou pode formar arvoretas que variam de três a oito metros de altura. Seu florescimento ocorre durante o verão e suas flores são hermafroditas, protândricas e auto-incompatíveis, estando organizadas em inflorescências terminais. Possuem fase masculina e feminina, sendo que na primeira as flores são planas, com a face interna das anteras voltada para cima, enquanto na segunda a flor constitui-se apenas de cálice e gineceu com estigma papiloso, úmido e interno. Apresenta nectários e atraente inflorescência (Figura 4) para os polinizadores, tendo sido registrada a presença de pássaros (ROCCA et al., 2006 e 2008). Seu fruto de formato globoso e deiscência basal contém sementes de forma semilunar, nem sempre viáveis ou em alta produção (FERREIRA, 1995).

Aspectos relacionados à sua fenologia, bem como em relação ao ambiente onde a espécie geralmente é encontrada, associados ao seu uso como planta ornamental, acarretaram a inserção de *N. brasiliensis* na lista de espécies ameaçadas de extinção no município do Rio de Janeiro (SECRETARIA MUNICIPAL DO MEIO AMBIENTE, 2000).

Estudos fitoquímicos realizados com *N. brasiliensis* revelaram a presença de triterpenos pentacíclicos que exibiram as atividades analgésica, anti-inflamatória, antitumoral e tripanocida (ROCHA, 2002). A atividade protetora do DNA também foi detectada a partir de extratos etanólicos do caule (AGRIPINO et al., 2004). Os testes realizados com *Trypanosoma cruzi* (ROCHA, 2002) indicaram 100% de inibição para o protozoário. Nesse contexto, os resultados estimulam estudos sobre outras doenças causadas por protozoários, como a malária, para a qual não existem relatos com a espécie em questão.

Este trabalho constitui o primeiro relato sobre o potencial de atividade antimalárica para *N. brasiliensis*, tanto para material cultivado *in vivo* quanto material produzido por técnicas biotecnológicas, validando outros estudos para a espécie.



Figura 3 - Habitus arbustivo de *Norantea brasiliensis*. Foto: Graziela da Silva Mello. Local: Condomínio Península - Barra da Tijuca - Rio de Janeiro. Data: 10/02/2011. Barra: 1,0 cm.



Figura 4 - Detalhe da inflorescência de *Norantea brasiliensis* exibindo nectários. Foto: Graziela da Silva Mello. Local: Condomínio Península - Barra da Tijuca - Rio de Janeiro. Data: 10/02/2011. Barra: 1,0 cm.

## 1 OBJETIVOS

### 1.1 Geral

Estabelecer um sistema de cultivo *in vitro* de *Norantea brasiliensis* visando à produção de metabólitos com possível atividade antimalárica.

### 1.2 Específicos

- Avaliar a influência de diferentes fitorreguladores e tipos de explantes na indução da calogênese de *N. brasiliensis*;
- Avaliar a influência de diferentes fitorreguladores, origem e tipos de explantes na indução de cultura de raízes de *N. brasiliensis*;
- Definir o sistema *in vitro* com maior produção de biomassa para avaliação do potencial medicinal;
- Avaliar o potencial antimalárico *in vivo e in vitro* de extratos metanólicos obtidos a partir do material produzido *in vitro* e material de campo;
- Avaliar a toxicidade das diferentes amostras utilizadas através do teste de letalidade com *Artemia salina* (BST);
- Definir o perfil fitoquímico do material vegetal considerando as condições de cultivo *in vivo e in vitro*.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

A parte experimental relativa ao cultivo vegetal *in vitro*, preparo de extratos e teste de citotoxicidade foi realizada no Laboratório de Biotecnologia de Plantas (LABPLAN), do Departamento de Biologia Vegetal (DBV), do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (IBRAG), da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ).

Os ensaios para a avaliação do potencial antimalárico foram realizados no Laboratório de Imunofarmacologia, do Departamento de Fisiologia e Farmacodinâmica, do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

Os ensaios para análise fitoquímica do material foram realizados no Laboratório de Produtos Naturais 1, do Instituto de Tecnologia em Fármacos (Far-Manguinhos), da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

### 2. 1 Material botânico

Um exemplar representativo de *N. brasiliensis* encontra-se depositado no Herbário da UERJ, sob o registro HRJ 11749.

#### 2. 1.1 Material vegetal *in vivo*

Como fonte de material *in vivo*, foram utilizados folhas, caules e raízes de *N. brasiliensis* provenientes do Loteamento de São Bento da Lagoa, Itaipuaçu, situado no município de Maricá – RJ. O material vegetal foi coletado em estado vegetativo no período compreendido entre a primavera e verão, no ano de 2010, com licença do SISBIO/IBAMA número 3299651.

#### 2. 1.2 Material vegetal *in vitro*

##### *Plantas propagadas in vitro*

Esta etapa foi desenvolvida conforme metodologia proposta por Sá e colaboradores (2010). Segmentos nodais, contendo dois nós e aproximadamente 1-1,5 cm, obtidos a partir de germinação *in vitro* em meio B5Ø (GAMBORG et al., 1968), foram inoculados em meio B5 acrescido do fitorregulador de crescimento Tidiazuron (TDZ) e mantidos em meio

contendo  $20\text{g/L}^{-1}$  de sacarose, solidificados com ágar (Merck®)  $8\text{g/L}^{-1}$ . O material foi mantido em câmara de crescimento, a  $26 \pm 2^\circ\text{C}$ , com intensidade luminosa de  $45 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  fornecida por lâmpadas fluorescentes, sob fotoperíodo de 16 h. Após 60 dias, os brotos obidos foram inoculado em meio B5Ø para posteriormente serem usadas como fonte de explantes.

### *Plantas germinadas in vitro*

As sementes foram coletadas em uma restinga preservada situada dentro do Condomínio Península, localizado na Barra da Tijuca, município do Rio de Janeiro, no período compreendido entre dezembro de 2010 e março de 2011. Foram lavadas três vezes por cinco minutos com solução de detergente comercial (10%), sob agitação. Em câmara de fluxo laminar, foi realizado o enxágue com água estéril, seguido pela desinfestação em solução de hipoclorito de sódio comercial a 2% acrescido de Tween 20 a 0,001%, por 20 minutos, sob agitação. Em seguida, as sementes foram submetidas a três lavagens com água estéril e, após a remoção do excesso de água com papel de filtro, inoculadas em meio de cultura B5 (GAMBORG et al., 1968), contendo sacarose a  $20\text{g/L}^{-1}$ . O pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem ( $121^\circ\text{C}$  por 15 min) e o meio foi solidificado com Agar (Merck®) a  $8\text{g/L}^{-1}$ . Foi inoculada uma semente por tubo contendo 10 mL de meio de cultura e vedado com tampa de alumínio. As culturas foram mantidas nas condições citadas anteriormente.

### *Calogênese*

Para início das culturas foram utilizados segmentos caulinares (1,0 cm) com um nó, foliares ( $0,5 \text{ cm}^2$ ) e radiculares (1,0 cm) de plantas propagadas *in vitro*, que foram inoculados em meio de cultura B5 acrescido de  $20\text{g/L}^{-1}$  de sacarose suplementado com diferentes auxinas e citocininas, ácido 1-naftaleno acético (ANA), 6-benzilaminopurina (BAP), ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico (PIC) e cinetina (6-furfurilaminopurina) (KIN), nas concentrações de 0,5; 1,0 e 3,0 e 5,0  $\text{mg.L}^{-1}$ . Os meios suplementados com ANA também foram avaliados em combinação com as citocininas BAP e KIN (Tabela 2). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem ( $121^\circ\text{C}$  por 15 min) e gelificado com agar (Merck®)  $8\text{g/L}^{-1}$ . Foram utilizados frascos de vidro (5 x 5,5 cm), contendo 20 mL de meio de cultura, vedados com tampas plásticas transparentes. Em cada pote, foi inoculado um explante caulinar, obedecendo a polaridade do órgão, e um explante foliar, com a face abaxial voltada para o

meio, num total de 15 explantes para cada tratamento. As culturas foram mantidas nas condições citadas anteriormente. Foram realizadas subculturas mensais para meios de igual composição, e ao final de três meses foram avaliados o acúmulo de massa calogênica (PF e PS) e qualquer outro tipo de resposta morfogênica foi acompanhada visualmente.

Tabela 2 - Composição dos meios de cultura utilizados na indução de calogênese de *N. brasiliensis* a partir de explantes caulinares, foliares e radiculares.

Meios de cultura	PIC (mg.L <sup>-1</sup> )	BAP (mg.L <sup>-1</sup> )	ANA (mg.L <sup>-1</sup> )	KIN (mg.L <sup>-1</sup> )
B5Ø	-	-	-	-
1	0,5			
2	1,0			
3	3,0			
4	5,0			
5		0,5	0,5	
6		1,0	0,5	
7		3,0	0,5	
8		5,0	0,5	
9			0,5	
10			1,0	
11			3,0	
12			5,0	
13			0,5	0,5
14			0,5	1,0
15			0,5	3,0
16			0,5	5,0

Legenda: B5Ø = meio B5 sem a presença de fitorreguladores; PIC= ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico; BAP= 6-benzilaminopurina; ANA= ácido 1-naftaleno acético; KIN= cinetina (6-furfurilaminopurina)

#### *Cultura de raízes*

Para início das culturas foram utilizados segmentos foliares (0,5 cm<sup>2</sup>), radiculares e caulinares (1,0 cm), contendo um nó, oriundos de plantas propagadas e germinadas *in vitro*, inoculados em meio de cultura B5 líquido e sólido acrescido de 20g/L<sup>-1</sup> de sacarose e suplementado com diferentes fitorreguladores da classe das auxinas (ANA, AIA, AIB) nas

concentrações de 0,5; 1,0 e 2,0 mg.L<sup>-1</sup> (Tabela 3). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem (121°C por 15 min) e no caso do meio sólido, foi empregado agar (Merck®) 8g/L<sup>-1</sup>. Foram utilizados frascos de vidro (8 x 6,5 cm), contendo 30 mL de meio de cultura e vedados com tampa de polipropileno. Cinco explantes radiculares foram inoculados por pote num total de três repetições para cada tratamento, enquanto três explantes foliares, assim como os caulinares, também foram inoculados por pote num total de cinco repetições. As culturas foram mantidas nas condições citadas anteriormente. Os experimentos mantidos em meio líquido ficaram em mesa giratória orbital (115 rotações por minuto). Foi realizada uma subcultura ao final de 30 dias para meios de igual composição. Os pesos de massa fresca e seca foram aferidos após seis semanas de cultura.

Tabela 3 - Composição dos meios de cultura utilizados na indução da cultura de raízes de *N. brasiliensis* a partir de explantes radiculares, caulinares e foliares.

Meios de cultura	ANA (mg.L <sup>-1</sup> )	AIA (mg.L <sup>-1</sup> )	AIB (mg.L <sup>-1</sup> )
B5Ø	-	-	-
1	0,5	-	-
2	1,0	-	-
3	2,0	-	-
4	-	0,5	-
5	-	1,0	-
6	-	2,0	-
7	-	-	0,5
8	-	-	1,0
9	-	-	2,0

Legenda: B5Ø = meio B5 sem a presença de fitorreguladores; ANA= ácido naftaleno acético; AIA= ácido indolacético; AIB= ácido indolbutírico

## 2.2 Identificação da substância pigmentada

A identificação da substância pigmentada, produzida em algumas culturas de calos e raízes oriundas de plantas propagadas *in vitro*, foi realizada por espectrofotômetro (Shimadzu UV - 160) em comprimentos de onda entre 200 a 800 nm. Cerca de 1 grama da substância foi homogeneizado em 25mL de Acetona PA (Vetec), agitando-se o conteúdo por 10 minutos. Em seguida 100µL da solução foi injetada no espectrofotômetro para a realização da leitura.



### 2.3 Análise microbiológica da substância pigmentada

A análise microbiológica ocorreu por inoculação de amostras da substância pigmentada em placa de Petri, contendo meio agar Müeller-Hinton (MH), e em tubos de ensaio contendo meio líquido Müeller-Hinton (MH). As placas foram incubadas em estufas a 37°C por 24 h, enquanto os tubos ficaram em temperatura ambiente ( $26 \pm 2^\circ\text{C}$ ) por 24 h.

### 2.4 Preparo dos extratos vegetais

Folhas, caules e raízes de plantas coletadas sob condições de campo em estágio vegetativo, assim como raízes obtidas por meio de técnicas de cultura de tecidos foram utilizados no preparo de extratos metanólicos. Após aferição da massa de matéria fresca e seca (estufa a 40°C), por 24h, as amostras foram submetidas à extração com álcool metílico P.A. (Merck) durante 15 dias, a  $26 \pm 2^\circ\text{C}$ , sob agitação em mesa giratória orbital (115 rotações por minuto). Os extratos obtidos foram filtrados em papel Whatman (nº1), concentrados sob pressão reduzida a 40°C e secos a vácuo até atingir um peso constante. O material foi armazenado a 4°C no escuro e solubilizado em dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma) 0,02%, quando da sua utilização.

### 2.5 Teste para detecção de atividade antimalárica

#### *Teste de quatro dias*

A avaliação inicial da atividade antimalárica foi realizada *in vivo* utilizando-se camundongo *Swiss*, machos, com 6 semanas de idade e peso médio de 25 gramas. Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno, contendo 5 camundongos cada uma. Estas foram mantidas em biotério com temperatura de  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  e ciclo de 12 horas claro/escuro.

Os animais foram provenientes do Centro de Criação de Animais (CECAL) da FIOCRUZ, com procedimentos aprovados pelo Comitê de Ética de Uso de Animais (CEUA), segundo o Protocolo 0213-4.

### *Preparo da solução de hemácias parasitadas*

A partir de animais oriundos do experimento de passagem, infectados com o *Plasmodium berghei* ANKA, foi realizado o esfregaço em lâminas histológicas a partir da coleta de sangue a partir da ponta da cauda do animal. As lâminas foram coradas pelo método panótico e a avaliação da parasitemia foi realizada com o auxílio de microscópio óptico, usando lente de imersão-aumento 100X. Em seguida, o sangue coletado dos animais foi diluído em tubos de citometria na proporção de 1:1000, contendo solução fisiológica salina, e 10  $\mu\text{L}$  da solução foi colocada em câmara de Neubauer, para a contagem das células. O número de células/mL foi avaliada pela fórmula:

$$\text{N}^\circ \text{ total de células contadas em 5 quadrantes} \times 5 \times \text{diluição da amostra} (10^3) \times \text{diluição na câmara} (10^4)$$

Após contagem celular, foi calculado o volume de sangue necessário para inocular  $10^7$  hemácias parasitadas, onde primeiro foi calculado o número de hemácias parasitadas necessárias através do cálculo da parasitemia (%). Em seguida o sangue foi coletado por punção cardíaca com auxílio de seringa de 1 mL previamente citratada (100-200  $\mu\text{L}$  de solução citrato de sódio 3,2 %), após sedação dos animais em câmara de  $\text{CO}_2$ .

### *Infecção dos animais*

Cada animal recebeu 200  $\mu\text{L}$  de solução PRBC (*parasited red blood cells*- hemácias parasitadas) via intraperitoneal (dia 0). Quatro horas após a infecção, os animais foram tratados via oral com 200  $\mu\text{L}$  da droga teste, cloroquina (25mg/Kg do peso do animal), 200  $\mu\text{L}$  do extrato a ser testado (concentrações de 25, 50 e 100 mg/Kg) e 200  $\mu\text{L}$  do veículo de diluição do extrato (DMSO 1%). Após a infecção, a parasitemia foi observada no dia 4, através de confecção de lâminas histológicas, coradas pelo método panótico e avaliadas por microscopia óptica. A sobrevivência dos animais foi avaliada durante 15 dias.

P					
0	1	2	3	4	15

Tratamento por via oral

### Sobrevida

P: parasitemia

### Teste *in vitro* com *Plasmodium falciparum*

#### *Cultura de P. falciparum*

Para os ensaios *in vitro* dos extratos vegetais, com o intuito de avaliar um possível efeito antimalárico, foi utilizada a cultura de *P. falciparum*. A manutenção da cepa Haiti HUCFF foi realizada de acordo com protocolo estabelecido por Trager & Jansen (1976).

A cultura foi realizada em ambiente totalmente estéril, com as células mantidas em garrafas de cultura (25 cm<sup>2</sup>) em estufa a 37° C e meio de cultura RPMI 1640, adicionado de 10% de plasma. Além disso, foi adicionada uma mistura primária padrão de gases que consiste de 5,2% de CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub> e nitrogênio para balanço.

A cultura do *P. falciparum* é realizada em hemácias humanas, já que este é um parasita intracelular obrigatório. Assim, o fornecimento de sangue para a manutenção da cultura e para realização dos experimentos ocorreu através de doação voluntária por pesquisadores servidores ou não e demais profissionais da equipe do laboratório de Imunofarmacologia do IOC-Fiocruz, que assinaram o termo de compromisso livre esclarecido (TCLE). A coleta foi realizada no próprio laboratório por um profissional da área de saúde com experiência em coletar líquidos biológicos dentro das normas de biossegurança estabelecidas e da ética em pesquisa. O formulário de consentimento para a coleta de sangue e o TCLE foi submetido ao comitê de ética em pesquisa para avaliação segundo a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde.

### *Avaliação do efeito antimalárico*

As células foram processadas para a realização do ensaio e consequente avaliação do possível efeito antimalárico das amostras a serem testadas. Quando houve a predominância da forma anel de pelo menos 4% (trofozoíta jovem) nos eritrócitos, foi feita uma sincronização com sorbitol a 5% que tem a função de preservar esta forma eliminando as outras existentes (trofozoíta maduro e esquizontes). Em seguida, a parasitemia foi contada de acordo com a seguinte forma:

$$\text{Parasitemia} = \frac{100 \times \text{NP}}{\text{NTC}}$$

NP = número de parasitas

NTC = número total de células (parasitadas ou não)

Posteriormente, dilui-se em sangue (50%) e meio (50%), para que a parasitemia chegasse a uma concentração de 0,5%. Esta solução foi diluída em meio de cultura adicionado de 10% de plasma a fim de atingir o hematócrito de 2% e 100µL foram aliqüotados em placas de 96 poços. Em seguida, 100µL dos extratos foram adicionados em três concentrações finais: 25, 50 e 100 µg/mL. Como controle negativo, as células foram mantidas somente com meio de cultura adicionado de plasma, e como controle positivo foi utilizado a droga cloroquina. Além disso, foi feito um terceiro tipo de controle onde se incubou somente o sangue não parasitado com meio acrescido de plasma para descontar o background de leitura de fluorescência para todas as amostras com sangue parasitado. A placa foi incubada no ambiente de gases da mistura padrão primária (5,2% de CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub> e nitrogênio) em recipientes fortemente vedados por 48 horas a 37°C. Após este tempo, a placa foi centrifugada (1.500 rpm por 10 minutos) e o meio de cultura retirado. O sangue de cada poço foi suspenso em tampão de lise de eritrócitos (20 mM Tris pH 7,5, 5 mM EDTA, 0,008% saponina e 0,08% triton X-100) adicionado de 0,2 µL Sybr Green por mililitro de solução (SMILKSTEIN *et al.*; 2004). As células foram deixadas em tampão de lise por 20 minutos em estufa à 37° C ao abrigo da luz para posterior leitura em espectrofotômetro de fluorescência.

Os espectros de emissão de excitação foram de 485 nm e 535 nm, respectivamente. A leitura da fluorescência se dá através das unidades relativas de fluorescência (RFU) sendo a leitura do background descontada das leituras das amostras. Assim, analisou-se a proliferação do parasita correlacionando a fluorescência dos eritrócitos parasitados controle, sem adição dos extratos vegetais com a fluorescência dos parasitados com as amostras em teste. O cálculo foi feito em percentual de inibição, onde a ausência de extrato foi considerada 100% de viabilidade.

## 2. 6 Teste de citotoxicidade

Para avaliar a citotoxicidade dos diferentes extratos foi utilizado o teste de letalidade com *Artemia salina* (BST) do acordo com MEYER e colaboradores (1982), com algumas modificações. Cerca de 1 g de ovos foi incubado em 100 mL de água do mar a 28 °C. Após 48 h, ocorreu a eclosão das larvas (*nauplios*) que foram utilizadas nos experimentos. Dez larvas foram transferidas, com o auxílio de uma pipeta Pasteur para tubos de ensaio contendo 5 mL de água do mar e concentrações crescentes dos extratos diluídos em Tween 80 (5%). Experimentos controle foram preparados com o cultivo das larvas apenas em água do mar e em Tween 80 (5%). Após 24 h do início dos experimentos, foi contabilizado o número de larvas vivas. Quando ocorreram mortes nos experimentos controle, os dados foram corrigidos pela fórmula abaixo, segundo AMARA e colaboradores (2008):

$$\% \text{ morte} = [(\text{mortos no teste} - \text{mortos no controle})/10] \times 100$$

A concentração letal para 50% (CL<sub>50</sub>) no intervalo de confiança de 95% foi determinada através do programa IBM-SPSS 60 (FINNEY, 1971). Todos os experimentos foram realizados em triplicata e repetidos três vezes.

## 2. 7 Análise estatística

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey, considerando significantes as diferenças com  $p \leq 0,05$ . As análises foram realizadas utilizando o programa estatístico GraphPad Prism 7.0.

## 2. 8 Perfil fitoquímico

Para a definição do perfil fitoquímico dos extratos, foram utilizadas no preparo das amostras, raízes obtidas a partir de plantas cultivadas *in vitro*, além de folhas, caules e raízes de exemplar em condições de campo, coletados em Itaipuaçu, no município de Maricá. O material foi seco em estufa a 45°C por 24 horas, pesado e triturado. As amostras foram imersas em álcool metílico P.A. (Merck) durante 15 dias, a temperatura ambiente, sob agitação e no escuro. Após filtração em papel Whatman (n°1), as amostras foram concentradas sob pressão reduzida a 40°C, secas a vácuo até atingir um peso constante e mantidos no escuro a 4°C.

### *Análise por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao Detector de Arranjo de Diodos (CLAE/DAD)*

As análises por CLAE/DAD foram realizadas nas seguintes condições: Modo isocrático ACN/solução aquosa de TFA 0,05% (30:70) por 55 minutos, fluxo de 1,0 mL/min em coluna LiChrospher 60 RP-Select B (5µm) 250 x 4mm, da Merck. Todas as injeções foram realizadas com volume de loop de 20 µL. A detecção foi realizada no ultravioleta no comprimento de onda de 325 nm.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Material vegetal cultivado *in vitro*

##### 3.1.1 Calogênese

Nos experimentos visando à calogênese em meio sólido contendo diferentes fitorreguladores, não foram alcançadas respostas positivas, sendo evidenciada alta taxa de oxidação, além da produção de uma substância de coloração laranja, que envolvia os explantes. Essa substância foi identificada como pertencente à classe dos carotenoides, por meio da obtenção de pico de absorção de 455 e 479 nm (Figura 5), que compreende a faixa típica de substâncias desta classe (FONTANA et al., 2000).

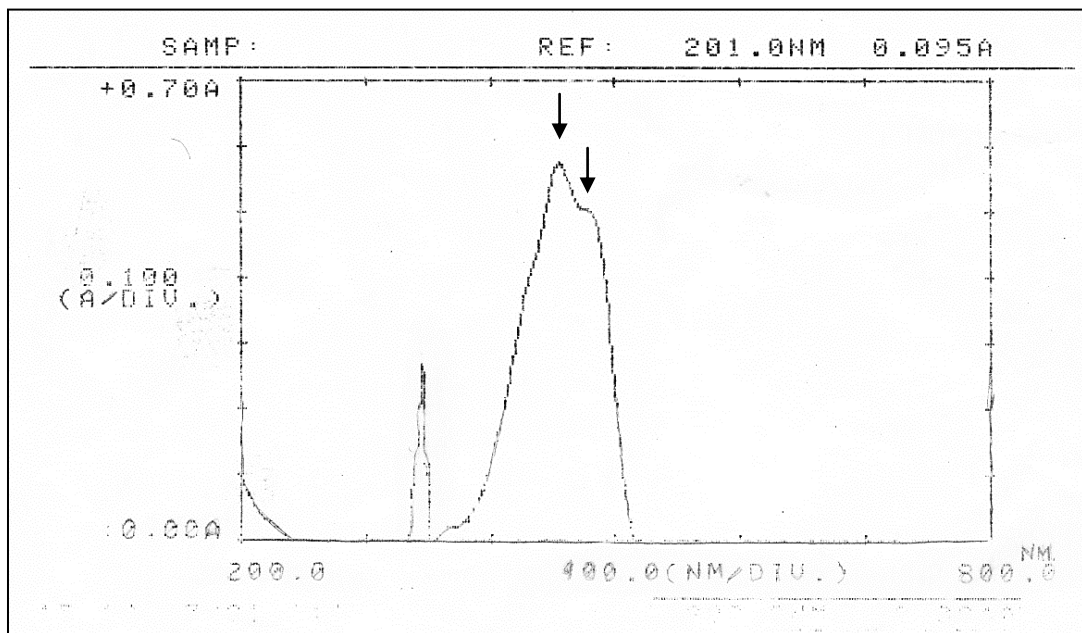


Figura 5 - Espectro de absorção das amostras de substância laranja produzida nas de culturas de raízes e calogênese. Setas: picos de absorbância máxima (455 e 479 nm).

Meios suplementados apenas com PIC ou com ANA adicionados de  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  de BAP, independentemente da concentração, propiciaram início de calejamento na base do explante caulinar no primeiro mês de cultivo, porém, ao final de 90 dias, todos se apresentavam oxidados (Figura 6a).

Quando foi utilizado o fitorregulador ANA sem a presença de BAP, os explantes foliares se curvaram e apresentaram tricomas no primeiro mês de cultivo. Contudo, o processo de oxidação ocorreu ao longo do segundo mês de cultivo, e se manteve até o final do experimento. Paralelamente, alguns explantes caulinares apresentaram a produção de raízes e brotos (Figura 6b).

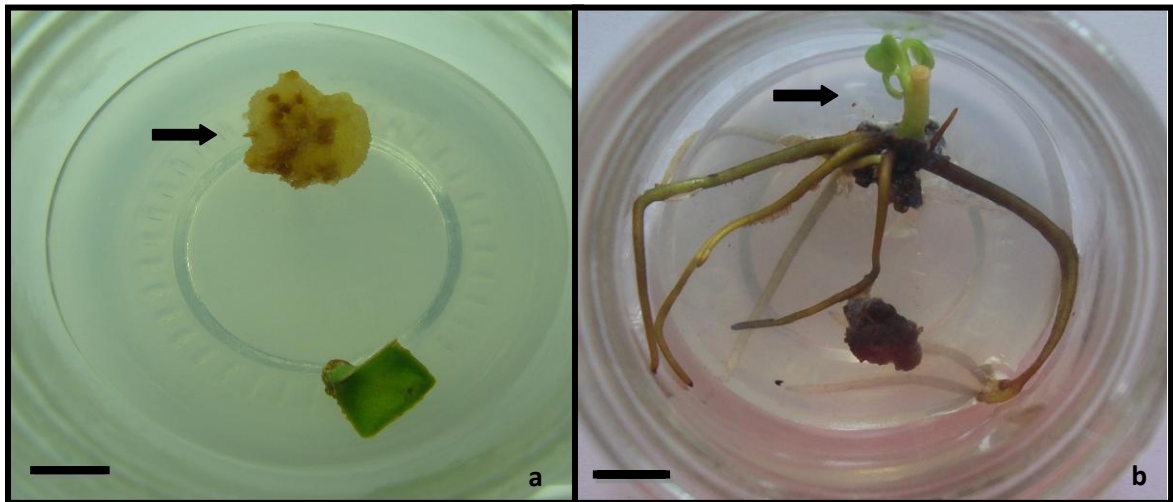


Figura 6 - Cultura *in vitro* de *N. brasiliensis*.

Legenda: a) Calo formado a partir de explante caulinar (seta) no primeiro mês de cultivo apresentando início de oxidação. b) Desenvolvimento de broto axilar a partir de explante caulinar (seta) e desenvolvimento de raízes. Barra: 1,0 cm.

Nos meios suplementados com KIN associado a  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  de ANA os explantes caulinares apresentaram discreto calejamento na base durante o primeiro mês de cultivo, assim como a formação de raízes, o que também foi observado em explantes foliares. As raízes apresentaram coloração verde e cresciam, contornando a área do pote de inoculação, até o segundo mês de cultivo. Posteriormente, o órgão começou a apresentar sinais de oxidação, que seguiu até o final do terceiro mês (Figura 7).





Figura 7 - Desenvolvimento de raízes de *N. brasiliensis* a partir de explantes caulinar e foliar, inoculados em meio B5 sólido suplementado com  $3,0 \text{ mg.L}^{-1}$  de KIN associado a  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  de ANA. Nota: Observa-se discreto calejamento na superfície e extenso crescimento radicular. Barra: 1,0 cm.

Quando explantes radiculares foram utilizados a fim de se obter resposta calogênica, esta não foi observada. Além disso, todos os explantes inoculados, em todas as concentrações dos fitorreguladores utilizadas, apresentaram alta taxa de produção de carotenoides ao final de 90 dias (Figura 8).

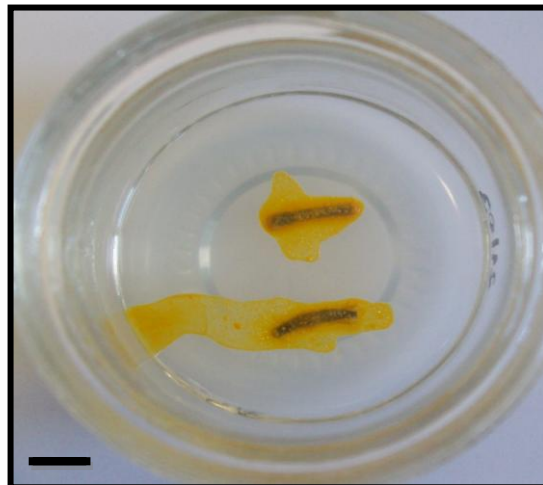


Figura 8 - Produção de carotenoides inibindo a resposta morfogênica em explantes caulinares inoculados em meio sólido suplementado com  $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$  de ANA. Barra: 1cm

Os protocolos testados mostraram resultados negativos para a produção de calos em *N. brasiliensis*. Contudo, o alto potencial rizogênico foi observado, o que direcionou o trabalho para a realização de experimentos visando à cultura de raízes, técnica de cultura de tecidos que tem sido indicada para a produção de metabólitos com potencial medicinal.

### 3.1.2 Cultura de raízes

#### - Produção de raízes a partir de plantas propagadas *in vitro*

Os experimentos para produção e multiplicação de raízes de *N. brasiliensis* a partir de plantas propagadas *in vitro* foram realizados com segmentos radiculares, foliares e caulinares. Os segmentos radiculares inoculados em meio líquido suplementado com AIA, independentemente da concentração utilizada, apresentaram formação de raízes adventícias verdes logo na segunda semana de cultivo, não havendo diferença significativa nos valores de peso fresco e seco (Tabela 4). Porém, os explantes inoculados em meio suplementado com  $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$  de AIA apresentaram, raízes adventícias exibindo a presença de pelos (Figura 9a). Além disso, alguns explantes apresentaram expressiva proliferação de células a partir da quarta semana de cultivo, caracterizando o processo de calogênese (Figura 9b).

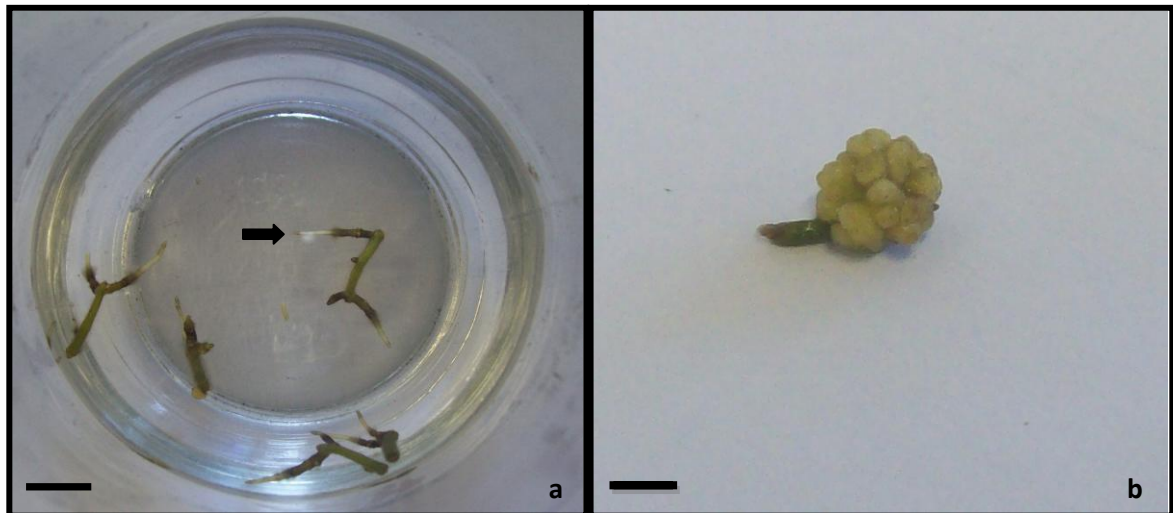


Figura 9 - Cultura *in vitro* de raízes de *N. brasiliensis* propagada a partir de explante radicular em meio B5 líquido suplementado com  $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$  de AIA.

Legenda: a) Desenvolvimento de raízes adventícias com pelos (seta) após 6 semanas de cultivo. b) Calo produzido ao final de seis semanas de cultivo. Barra: 1,0 cm.

Quando inoculados em meio sólido suplementado com AIA, os segmentos radiculares não apresentaram a formação de raízes em nenhuma das concentrações (Tabela 4), sendo evidenciado a partir da terceira semana, apenas a produção de carotenoides envolvendo os explantes, o que se tornou constante até a sexta semana, mesmo após a subcultura.

Nos experimentos realizados em meio líquido, suplementados com o fitorregulador AIB, observou-se a oxidação de todos os explantes, em todas as concentrações, logo na terceira semana de inoculação. Entretanto, quando cultivados em meio sólido, os explantes apresentaram a formação de raízes laterais por volta da terceira semana, onde foi possível evidenciar também a presença de pelos, sendo que os maiores valores de peso fresco e seco foram obtidos na maior concentração testada (Tabela 4). Porém, a partir da quarta semana, os inóculos mantidos a 1,0 e 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de AIB começaram a produzir carotenoides, que foi constante até a sexta semana, mesmo após a subcultura.

Quando utilizado o fitorregulador ANA, tanto em meio líquido quanto sólido, os explantes radiculares oxidaram-se em todos os experimentos, não apresentando a formação de raízes (Tabela 4). Os segmentos em meio líquido apresentaram-se intumescidos e com aparência mais verde, enquanto os mantidos em meio sólido estavam totalmente oxidados após seis semanas de cultivo.

Tabela 4 - Avaliação dos pesos de matéria fresca e seca de raízes obtidas a partir de explantes radiculares de plantas de *Norantea brasiliensis* propagadas *in vitro* e cultivados em meio B5 suplementado com diferentes auxinas, após seis semanas de cultivo.

Fitorregulador	Concentração (mg/L)	Meio líquido		Meio sólido	
		Peso fresco (g)	Peso seco (g)	Peso fresco (g)	Peso seco (g)
Controle (sem auxina)	-	-	-	-	-
	0,5	-	-	-	-
ANA	1,0	-	-	-	-
	2,0	-	-	-	-
	0,5	-	-	0,2055± 0,2596 a	0,0047± 0,0004 c
AIB	1,0	-	-	0,2020± 0,0198 a	0,0188± 0,0017 b
	2,0	-	-	0,2078± 0,0210 a	0,0206± 0,0014 a
	0,5	0,2123± 0,0662 a	0,0250± 0,0082 a	-	-
AIA	1,0	0,1957± 0,1761 a	0,0243± 0,0230 a	-	-
	2,0	0,1335± 0,0211 a	0,0126± 0,0016 a	-	-

Legenda: - = ausência de crescimento. Resultados representam a média ± desvio padrão. Letras iguais na mesma coluna indicam que as médias não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (5%).

As culturas de raízes oriundas de explantes foliares, estabelecidas em meio sólido suplementado com AIA apresentaram, a partir da terceira semana de cultivo, início de formação de raízes, que saíam da região mediana da folha, independentemente da concentração de fitorregulador utilizada no meio (Figura 10a). Além disso, foi evidenciada a produção de  $\beta$ -caroteno em torno do explante.

Quando os explantes foliares foram inoculados em meio sólido com AIB, foi evidenciada a produção de raízes a partir da segunda semana. Estas apresentavam pelos e saíam da região mediana do explante. Seu crescimento se deu em torno do pote passando a ocupar a parte superior do recipiente. Destas raízes formaram-se raízes laterais. Ao final de seis semanas os explantes e as raízes apresentavam partes verdes e partes oxidadas (Figura 10b).

Nos experimentos realizados em meio sólido acrescido de ANA, em todas as concentrações testadas, as raízes produzidas apresentavam-se pilosas, de coloração esverdeada e saíam da região de mediana do explante (Figura 10c). Houve diferença significativa no peso fresco apenas na concentração de  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ , mas não havendo esta diferença quando analisado o peso seco (Tabela 5).

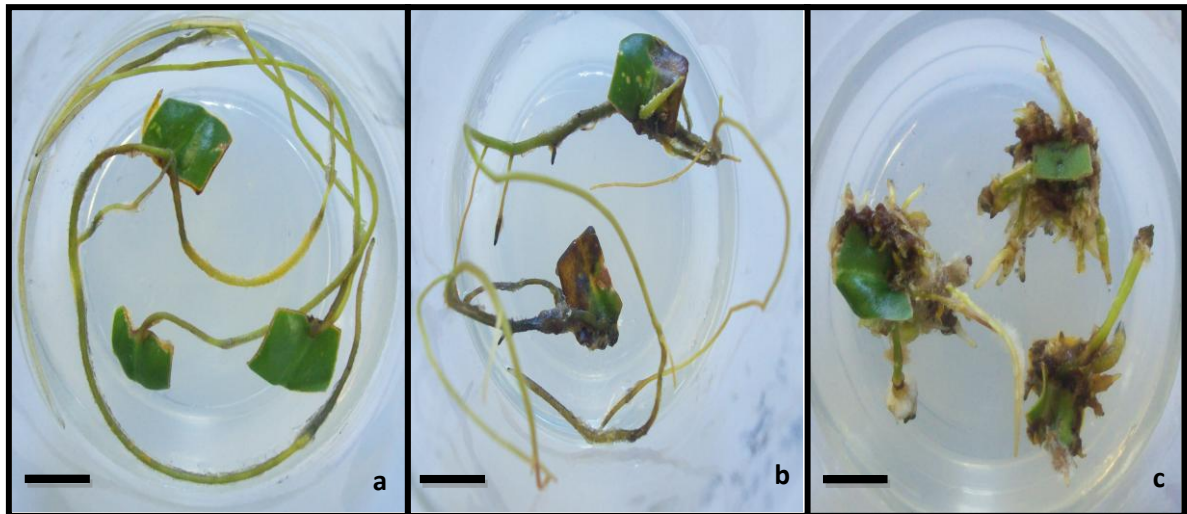


Figura 10 - Resposta morfogênica de explantes foliares de plantas de *N. brasiliensis* propagadas *in vitro*, cultivados em meio B5 sólido suplementado com diferentes fitorreguladores, após seis semanas de cultivo.

Legenda: a) Raízes mais numerosas e longas em meio com  $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$  de AIA. b) Explantes com áreas oxidadas em meio com  $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$  de AIB. c) Raízes curtas e com profusão de pelos em meio com  $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$  de ANA. Barra: 1,0 cm.

Explantes foliares inoculados em meio líquido suplementado com AIA, AIB ou ANA, independentemente da concentração usada, apresentaram oxidação logo na terceira semana de cultivo, não havendo resposta rizogênica (Tabela 5).

Tabela 5 - Avaliação dos pesos de matéria fresca e seca de raízes obtidas a partir de explantes foliares de plantas de *Norantea brasiliensis* propagada *in vitro* e cultivados em meio B5 suplementado com diferentes fitorreguladores, após seis semanas de cultivo.

Fitorregulador	Concentração (mg/L)	Meio líquido		Meio sólido	
		Peso fresco (g)	Peso seco (g)	Peso fresco (g)	Peso seco (g)
Controle (sem auxina)	-	-	-	-	-
	0,5	-	-	1,0661± 0,4622 b	0,0815± 0,0236 a
ANA	1,0	-	-	1,581± 0,2276 a	0,0786± 0,0282 a
	2,0	-	-	1,5354 ± 0,2494 a	0,1065± 0,0294 a
	0,5	-	-	0,4281± 0,2490 ab	0,0579± 0,0276 b
AIB	1,0	-	-	0,6302± 0,1555 ab	0,2309± 0,2426 b
	2,0	-	-	0,7022± 0,0976 ac	0,1318± 0,0353 b
	0,5	-	-	0,4467± 0,1317c	0,0479± 0,0204 c
AIA	1,0	-	-	0,1887± 0,0176 cd	0,0312± 0,0689 c
	2,0	-	-	0,2459± 0,0651 cd	0,0703± 0,0170 c

Legenda: - = ausência de crescimento. Resultados representam a média ± desvio padrão. Letras iguais na mesma coluna indicam que as médias não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (5%).

Nos segmentos caulinares com um nó que foram inoculados em meio sólido suplementado com ANA ou AIB, não houve resposta rizogênica em nenhuma das concentrações testadas, sendo evidenciada alta produção de carotenoide a partir da segunda semana (Figura 11a). Os explantes caulinares inoculados em meio sólido suplementado com AIA apresentaram o desenvolvimento de brotos axilares (Figura 11b), embora tenha sido observada a produção de carotenoide.

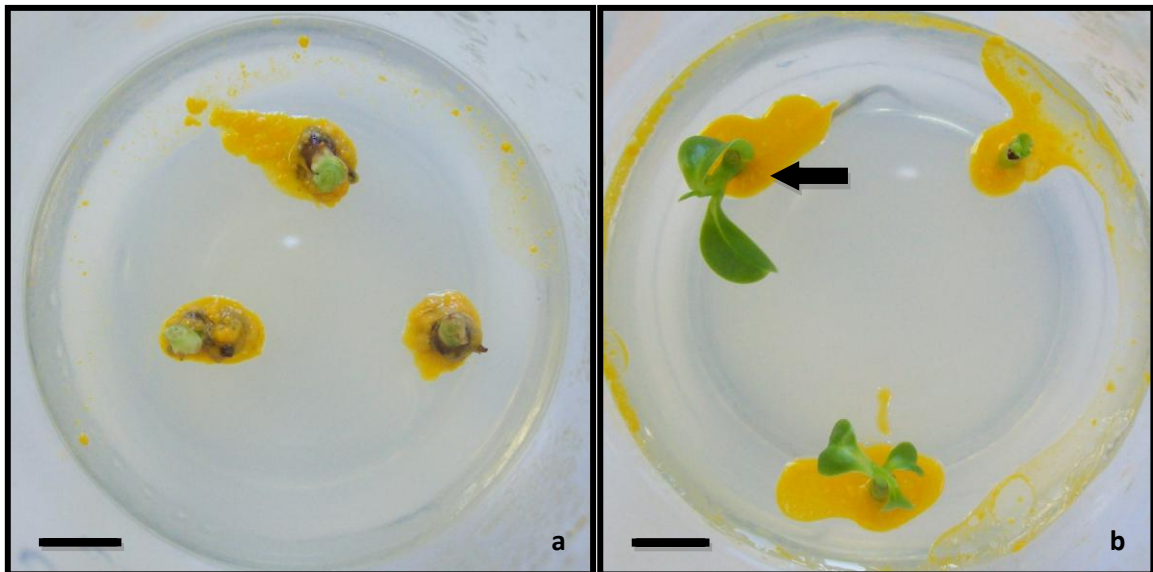


Figura 11 - Resposta morfogênica de explantes caulinares em meio sólido oriundos de plantas de *N. brasiliensis* propagadas *in vitro*, após três meses de cultivo.

Legenda: a) Produção de carotenoide circundando os explantes caulinares inoculados em meio suplementado com  $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$  de ANA e discreto calejamento na região superior (verde claro) dos explantes. b) Desenvolvimento de brotos axilares (seta) a partir de explante caulinar inoculado em meio suplementado com  $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$  de AIA. Barra: 1,0 cm

Os explantes caulinares inoculados em meio líquido apresentaram sinais de oxidação a partir da terceira semana nos meios com ANA e AIB, apresentando alta produção de carotenoide, não sendo observada resposta rizogênica. Já em explantes inoculados em meio líquido suplementado com AIA, ocorreu o desenvolvimento de brotos axilares e produção de poucas raízes (Figura 12), onde a concentração de  $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$  resultou em maiores valores de biomassa (Tabela 6).





Figura 12 - Desenvolvimento de brotos axilares e produção de raízes (seta) a partir de explantes caulinares de *Norantea brasiliensis* propagada *in vitro*, inoculados em meio B5 líquido suplementado com  $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$  de AIA, após seis semanas de cultivo. Barra: 1 cm

Tabela 6 - Avaliação dos pesos de matéria fresca e seca de raízes obtidas a partir de explantes caulinares de plantas de *Norantea brasiliensis* propagada *in vitro* e cultivado em meio B5 suplementado com diferentes auxinas, após seis semanas de cultivo.

Fitorregulador	Concentração (mg/L)	Meio líquido		Meio sólido	
		Peso fresco (g)	Peso seco (g)	Peso fresco (g)	Peso seco (g)
Controle (sem auxina)	-	-	-	-	-
ANA	0,5	-	-	-	-
	1,0	-	-	-	-
	2,0	-	-	-	-
AIB	0,5	-	-	-	-
	1,0	-	-	-	-
	2,0	-	-	-	-
AIA	0,5	0,0235± 0,0041a	0,0020± 0,0001b	-	-
	1,0	0,0215± 0,0027a	0,0022± 0,0032b	-	-
	2,0	0,0250± 0,0076a	0,0023± 0,0004b	-	-

Legenda: - = ausência de crescimento. Resultados representam a média ± desvio padrão. Letras iguais na mesma coluna indicam que as médias não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (5%).

- Produção de raízes a partir de plantas germinadas *in vitro*

Para a produção de raízes a partir de plantas germinadas *in vitro* foi utilizado o mesmo protocolo aplicado quando plantas propagadas *in vitro* foram usadas como fonte de explantes.

Explantes radiculares inoculados tanto em meio líquido quanto sólido, suplementados com a auxina ANA, apresentaram sinais de oxidação a partir da terceira semana, o que se manteve até o final de seis semanas (Figura 13 a e b).

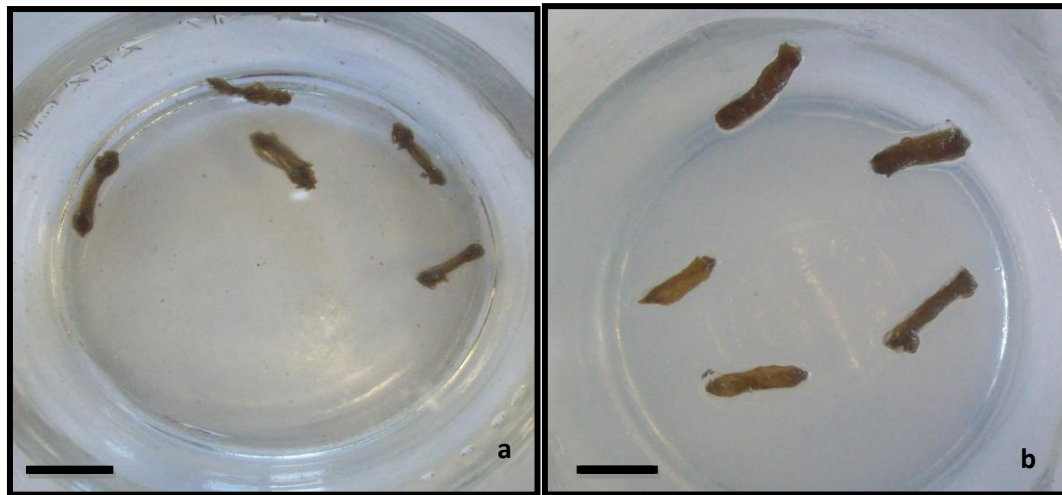


Figura 13 - Explantes radiculares de plantas de *N. brasiliensis* obtidas por germinação *in vitro*, cultivados em meio B5, ao final de quatro semanas de cultivo.

Legenda: a) Aspecto dos explantes em meio líquido suplementado com  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  de ANA. b) Aspecto dos explantes em meio sólido suplementado com  $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$  de ANA. Barra: 1 cm

A suplementação com o fitorregulador AIB em meio líquido, resultou apenas no surgimento de algumas protuberâncias (Figura 14a), enquanto que em meio sólido houve a formação de raízes em todas as concentrações testadas, não havendo diferença significativa nos valores de biomassa (Tabela 7). As raízes, que começaram a surgir a partir da segunda semana, eram finas, de coloração esverdeada e apresentavam alta pilosidade (Figura 14b).

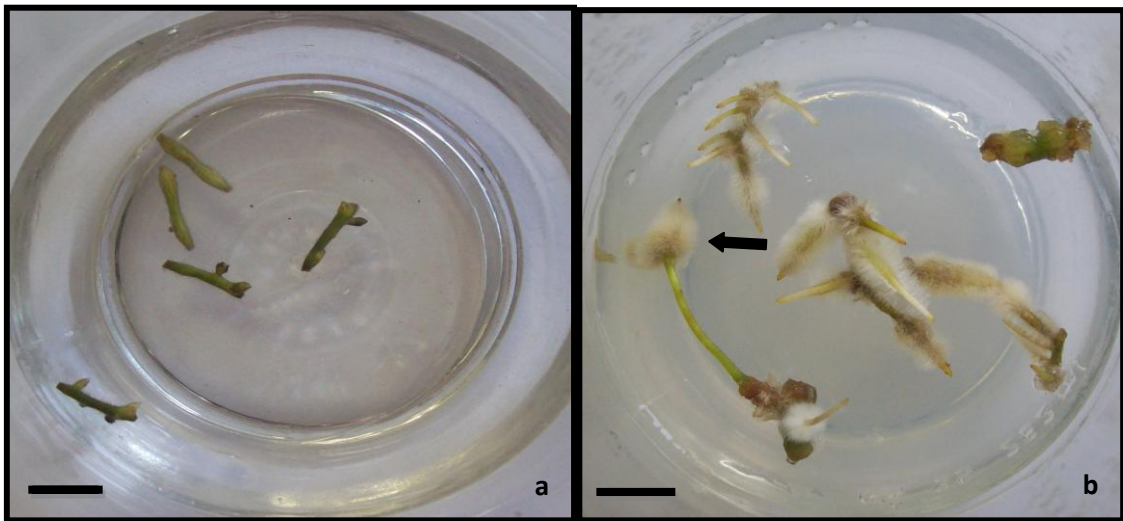


Figura 14 - Resposta morfogênica de explantes radiculares de *N. brasiliensis* germinadas *in vitro*, cultivados em meio B5 suplementado com  $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$  de AIB, ao final de seis semanas de cultivo.

Legenda: a) Aspecto dos explantes em meio líquido, com o surgimento de protuberâncias.

b) Emissão de primórdios radiculares (seta) em meio sólido. Barra: 1 cm

Nos experimentos realizados em meio líquido e sólido suplementado com o fitorregulador AIA, observou-se a partir da terceira semana a produção de raízes adventícias finas, de coloração esverdeada, bem como a presença de pelos, em todas as concentrações (Figura 15 a e b).

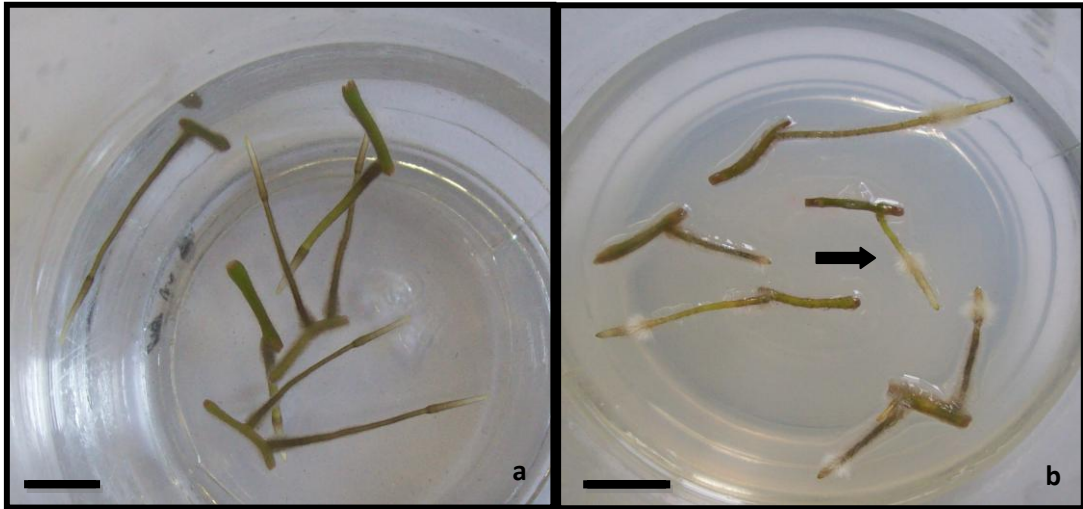


Figura 15 - Resposta morfológica de explantes radiculares de plantas de *N. brasiliensis* obtidas por germinação *in vitro*, cultivados em meio B5, ao final de seis semanas.

Legenda: a) Produção de raízes por organogênese direta em meio líquido suplementado com  $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$  de AIA. b) Produção de raízes por organogênese direta meio sólido suplementado com  $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$  de AIA. Barra: 1 cm

Tabela 7 - Avaliação dos pesos de matéria fresca e seca de raízes obtidas a partir de explantes radiculares de plantas de *Norantea brasiliensis* obtidas por germinação *in vitro*, cultivado em meio B5 suplementado com diferentes fitorreguladores, após seis semanas de cultivo.

Fitorregulador	Concentração (mg/L)	Meio líquido		Meio sólido	
		Peso fresco (g)	Peso seco (g)	Peso fresco (g)	Peso seco (g)
Controle	-	-	-	-	-
(sem auxina)					
	0,5	-	-	-	-
ANA	1,0	-	-	-	-
	2,0	-	-	-	-
	0,5	-	-	0,2727± 0,0760 b	0,0629± 0,0678 a
AIB	1,0	-	-	0,5172± 0,1564 a	0,1145± 0,1995 a
	2,0	-	-	0,3639± 0,1100 ab	0,0369± 0,0369 a
	0,5	0,0351± 0,0067 c	0,0073± 0,0036 a	0,1218± 0,0212 d	0,0260± 0,0051 b
AIA	1,0	0,0772± 0,0155 b	0,0123± 0,0059 a	0,2060± 0,3052 c	0,0250± 0,0043 b
	2,0	0,1004± 0,0122 a	0,0095± 0,0016 a	0,1678± 0,0269 e	0,0917± 0,1359c

Legenda:- = ausência de crescimento. Resultados representam a média ± desvio padrão. Letras iguais na mesma coluna indicam que as médias não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (5%).

Explantos foliares inoculados em meio sólido suplementado com os diferentes fitorreguladores apresentaram resposta rizogênica em todas as concentrações utilizadas (Figura 16).

A produção de raízes a partir de explantes inoculados em meio suplementado com AIA foi reduzida (Figura 16a) quando comparada aos valores de matéria fresca e seca produzidas em meio suplementado com outras auxinas (Tabela 8). Paralelamente, a inoculação dos segmentos em meio sólido suplementado com as auxinas AIB e ANA apresentaram alta capacidade rizogênica, onde foram produzidas raízes compridas, de coloração esverdeada e com a presença de pelos que saíam da região mediana do explante (Figura 16 b e c).

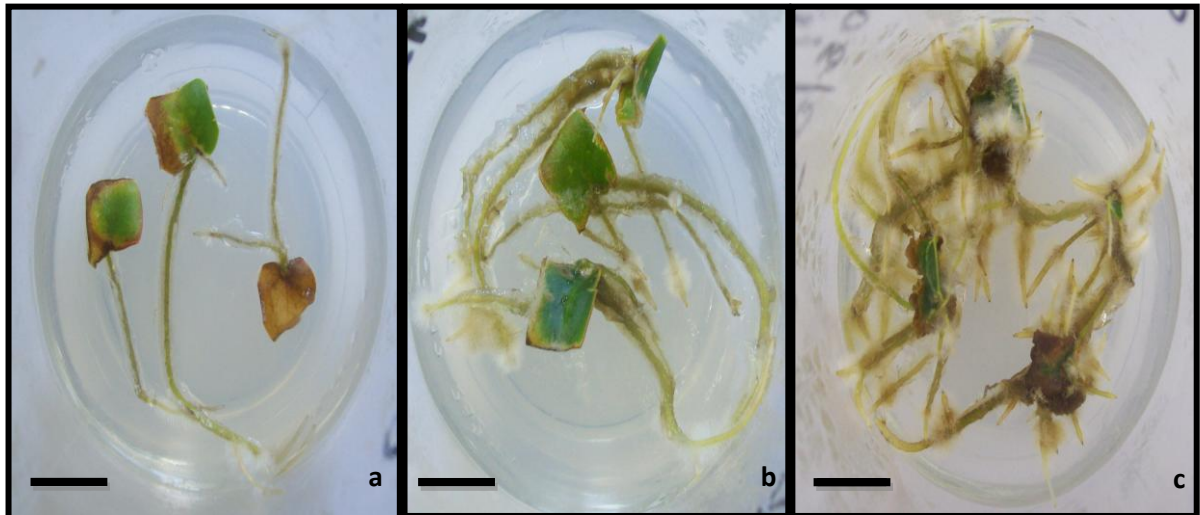


Figura 16 - Resposta morfogênica de explantes foliares de plantas de *N. brasiliensis* obtidas por germinação *in vitro*, cultivados em meio B5 sólido contendo diferentes auxinas, ao final de seis semanas de cultivo.

Legenda: a) Explantes com áreas oxidadas e baixa produção de raízes em meio contendo  $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$  de AIA; b) Produção de numerosas e longas raízes em meio com  $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$  de AIB; c) Alta produção de raízes em meio com  $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$  de ANA. Barra: 1,0 cm.

Explantos foliares inoculados em meio líquido suplementado com AIA, AIB ou ANA, independentemente da concentração testada, apresentaram oxidação, não havendo resposta rizogênica até a terceira semana de cultivo (Tabela 8).

Tabela 8 - Avaliação dos pesos de matéria fresca e seca de raízes obtidas a partir de explantes foliares de plantas de *Norantea brasiliensis* obtidas por germinação *in vitro*, cultivados em meio B5 suplementado com diferentes fitorreguladores, após seis semanas de cultivo.

Fitorregulador	Concentração (mg/L)	Meio líquido		Meio sólido	
		Peso fresco (g)	Peso seco (g)	Peso fresco (g)	Peso seco (g)
Controle (sem auxina)	-	-	-	-	-
	0,5	-	-	1,1823± 0,1002 b	0,0843± 0,0080 b
ANA	1,0	-	-	0,8083± 0,4384 b	0,1608± 0,2498 b
	2,0	-	-	2,0958± 0,1554 a	1,1891± 0,2130 a
	0,5	-	-	0,2965± 0,0953 e	0,0224± 0,0067 e
AIB	1,0	-	-	0,3183± 0,0989 e	0,0228± 0,0049 e
	2,0	-	-	0,2714± 0,1080 e	0,0249± 0,0084 e
	0,5	-	-	0,1688± 0,0272 d	0,0464± 0,0064 d
AIA	1,0	-	-	0,1732± 0,0248 d	0,0416± 0,0057 d
	2,0	-	-	0,5448± 0,0884 c	0,0667± 0,0106 c

Legenda: - = ausência de crescimento. Resultados representam a média ± desvio padrão. Letras iguais na mesma coluna indicam que as médias não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (5%).



Segmentos caulinares oriundos de plantas obtidas por germinação *in vitro* também serviram como fonte de material para os experimentos de cultura de raízes. Em meio líquido suplementado com ANA os explantes ficaram intumescidos e com sinais de oxidação a partir da segunda semana, o que foi evidenciado até o final da sexta semana, não apresentando produção de raízes (Figura 17a). Já os explantes inoculados em meio líquido suplementado com AIB mostraram boa capacidade rizogênica em todas as concentrações testadas. Raízes compridas e com regiões de tonalidade amarronzada foram produzidas ao longo de todo o explante (Figura 17b).

Quando a auxina AIA foi testada em meio líquido visando à produção de raízes, a partir de explantes caulinares, foram produzidos brotos axilares, com pelo menos um par de folhas, tamanho médio de 1,5 cm e que saíam da região de nó do caule (Figura 17c).

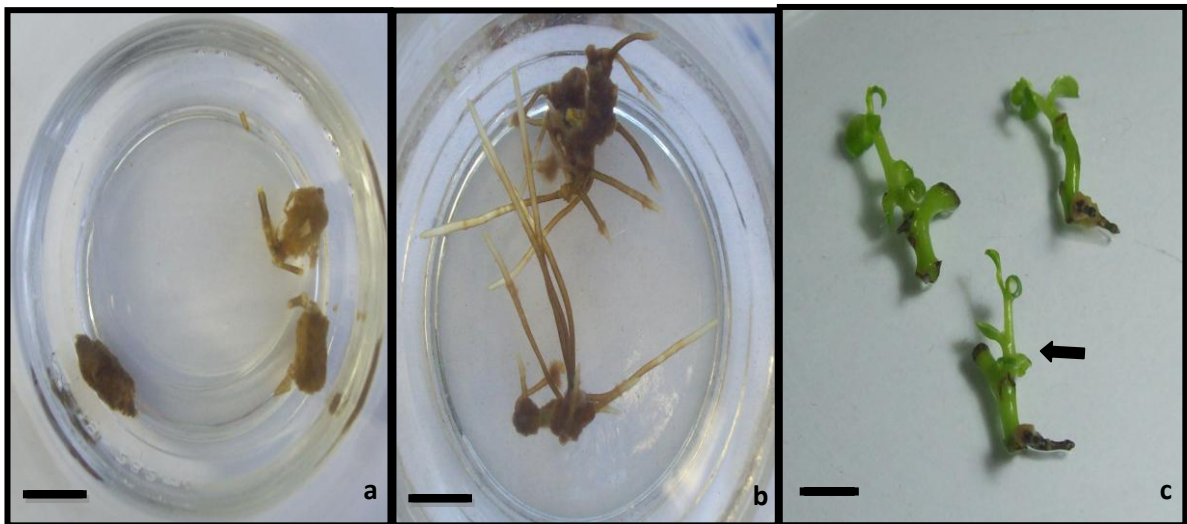


Figura 17 - Resposta morfogênica de explantes caulinares de plantas de *N. brasiliensis* obtidas por germinação *in vitro*, cultivados em meio B5 líquido suplementado com diferentes auxinas, ao final de seis semanas de cultivo.

Legenda: a) Raízes curtas produzidas em meio líquido suplementado com  $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$  de ANA; b) Raízes longas produzidas por organogênese direta em meio líquido com  $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$  de AIB; c) Brotos axilares (seta) desenvolvidos em meio líquido suplementado com  $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$  de AIA, após 45 dias. Barra: 1,0 cm.

Explantes caulinares inoculados em meio B5 sólido suplementado com ANA apresentaram alta taxa rizogênica em todas as concentrações testadas. As raízes produzidas eram de coloração amarronzada com a presença de primórdios radiculares, que cresceram a

partir da base do explante. Foi observada a produção de um broto por explante que saía da região de nó (Figura 18a).

Quando o meio foi suplementado com a auxina AIA não ocorreu formação de raízes, sendo evidenciada apenas a produção de brotos por organogênese direta (Figura 18b).

Em meio suplementado com o fitorregulador AIB a resposta morfogênica apresentou-se de forma variável, quando comparada às respostas das outras culturas em presença de outras auxinas. Alguns explantes produziram brotos e raízes e outros se mostraram oxidados ao final de seis semanas (Figura 18c).

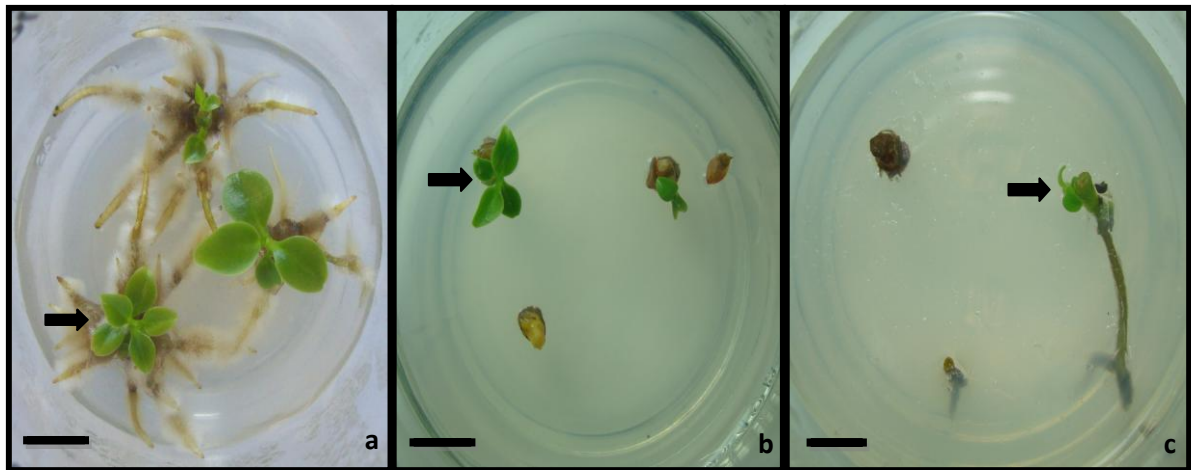


Figura 18 - Resposta morfogênica de explantes foliares de plantas de *N. brasiliensis* obtidas por germinação *in vitro*, cultivados em meio B5 sólido suplementado com diferentes auxinas, ao final de seis semanas de cultivo.

Legenda: a) Produção de raízes e brotos (seta) em meio com  $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$  de ANA. b) Produção de brotos axilares (seta) desenvolvidos em meio com  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  de AIA. c) Produção de brotos e poucas raízes (seta) em meio com  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  de AIB. Barra: 1,0 cm.

Tabela 9 - Avaliação dos pesos de matéria fresca e seca de raízes obtidas a partir de explantes caulinares de plantas de *Norantea brasiliensis* obtidas por germinação *in vitro*, cultivados em meio B5 suplementado com diferentes fitorreguladores, após seis semanas de cultivo.

Fitorregulador	Concentração (mg/L)	Meio líquido		Meio sólido	
		Peso fresco (g)	Peso seco (g)	Peso fresco (g)	Peso seco (g)
Controle (sem auxina)	-	-	-	-	-
	0,5	-	-	1,1892± 0,0905 b	0,2050± 0,0101 c
ANA	1,0	-	-	1,3211± 0,0502 b	0,2520± 0,0160 b
	2,0	-	-	2,5502± 0,2405 a	0,2979± 0,0317 a
	0,5	0,1894± 0,0268 a	0,0184± 0,0016 b	-	-
AIB	1,0	0,2126± 0,0258 a	0,0181± 0,0010 b	-	-
	2,0	0,2165± 0,0207 a	0,0189± 0,0006 b	-	-
	0,5	-	-	-	-
AIA	1,0	-	-	-	-
	2,0	-	-	-	-

Legenda: - = ausência de crescimento. Resultados representam a média ± desvio padrão. Letras iguais na mesma coluna indicam que as médias não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (5%).

### 3.2 Testes antimaláricos

#### 3.2.2 Testes *in vivo*

##### *Teste de quatro dias*

Na avaliação de um possível efeito antimalárico do extrato metanólico obtido a partir de raízes de *N. brasiliensis* cultivada *in vivo* somente a dose de 50 mg/kg apresentou redução significativa da parasitemia em torno de 33,5 % quando comparada com o controle não tratado (Figura 19). Ao ser avaliada a sobrevivência dos animais (figura 20), foi possível observar que os óbitos ocorreram a partir do 9º dia de experimento e a dose de 50 mg/kg resultou em maior sobrevivência, com cerca de 50% dos animais vivos, ao final de 15 dias (Figura 20). No controle positivo, todos os animais permaneceram vivos durante os 15 dias de observação.

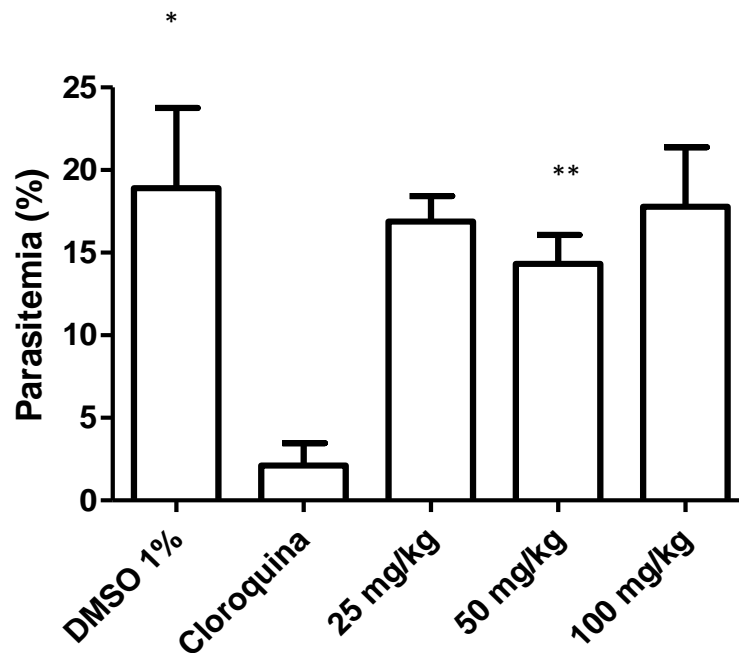


Figura 19 - Parasitemia média em camundongos infectados pelo *Plasmodium berghei* (ANKA). O tratamento foi realizado via oral por quatro dias consecutivos com 25, 50 e 100 mg/kg de extrato metanólico obtido a partir de raízes de *N. brasiliensis* cultivada *in vivo*. O veículo utilizado para a diluição das amostras foi o DMSO 1% e como controle positivo foi utilizada a cloroquina (25 mg/kg). No quinto dia após a infecção, cortou-se as caudas dos animais e realizou-se o esfregaço em lâminas sendo estas posteriormente coradas e observadas em microscópio óptico no aumento de 100X. Os resultados expressam média  $\pm$  desvio padrão de dois experimentos independentes com cinco animais por amostra. Considerou-se significativa as diferenças representadas pelo asterisco onde  $p \leq 0,05$  em relação ao controle tratado com o veículo.

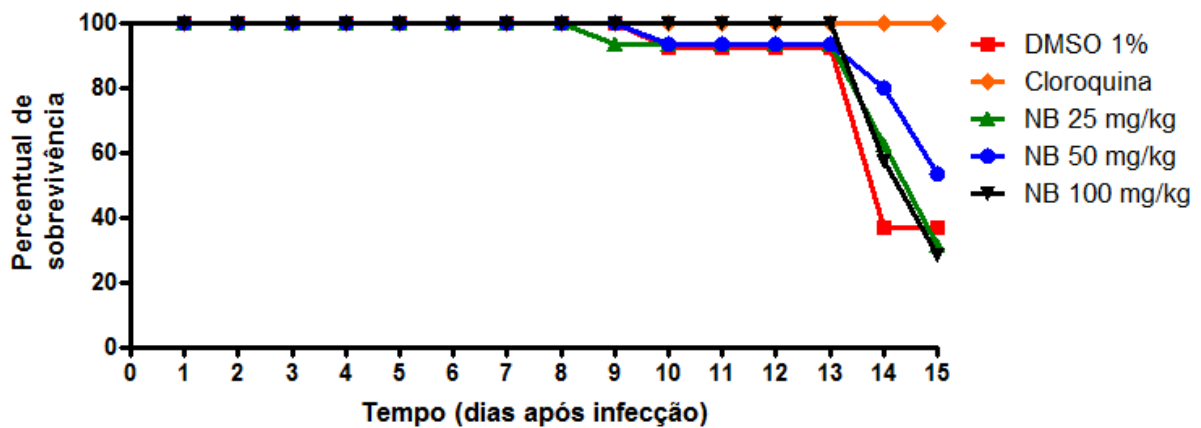


Figura 20 - Sobrevida dos animais tratados com extrato metanólico obtido a partir de raízes de *N. brasiliensis* cultivada *in vivo*, durante 15 dias após a infecção com *P. berghei* ANKA. Gráfico representativo de um experimento independente.

Os animais que receberam o extrato de folhas não apresentaram redução significativa do percentual da parasitemia em relação ao controle, em todas as doses testadas (Figura 21). Os óbitos foram registrados a partir do 7º dia, onde ao final do experimento todos os animais tratados com doses na concentração de 25mg/kg estavam mortos (Figura 22).

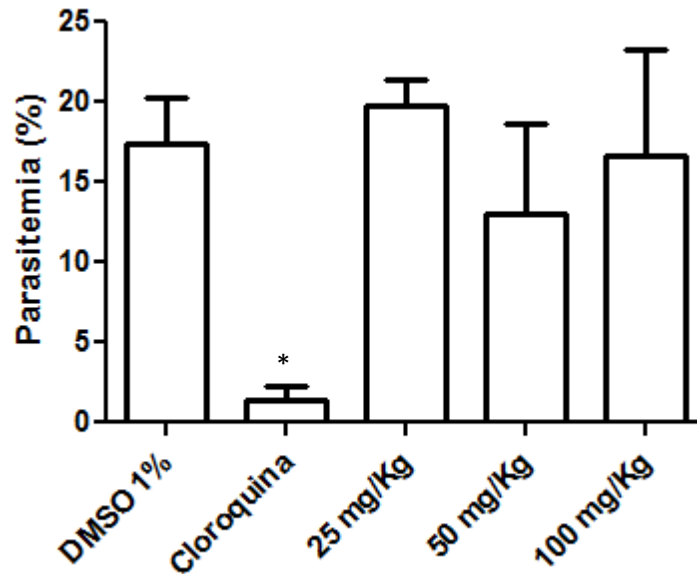


Figura 21 - Parasitemia média em camundongos infectados pelo *Plasmodium berghei* (ANKA). O tratamento foi realizado via oral por quatro dias consecutivos com 25, 50 e 100 mg/kg de extrato metanólico obtido a partir de folhas de *N. brasiliensis* cultivada *in vivo*. O veículo utilizado para a diluição das amostras foi o DMSO 1% e como controle positivo foi utilizada a cloroquina (25 mg/kg). No quinto dia após a infecção, cortou-se as caudas dos animais e realizou-se o esfregaço em lâminas sendo estas posteriormente coradas e observadas em microscópio ótico no aumento de 100X. Os resultados expressam média  $\pm$  desvio padrão de dois experimentos independentes com cinco animais por amostra. Considerou-se significativa as diferenças representadas pelo asterisco onde  $p \leq 0,05$  em relação ao controle tratado com o veículo.

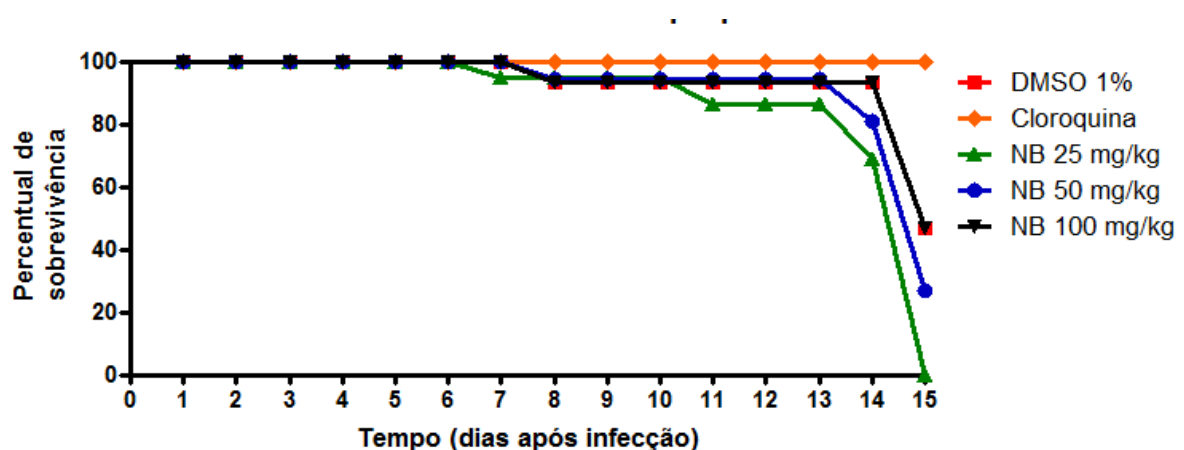


Figura 22 - Sobrevida dos animais tratados com extrato metanólico obtido a partir de folhas de *N. brasiliensis* cultivada *in vivo*, durante 15 dias após a infecção com *P. berghei* ANKA. Gráfico representativo de um experimento independente.

Os testes realizados com extrato de caules de *N. brasiliensis* não mostraram diferença significativa entre as doses testadas (Figura 23). Os óbitos foram registrados a partir do 7º dia, onde ao final do experimento cerca de 60% dos animais tratados com doses na concentração de 50 e 100 mg/kg estavam vivos (Figura 24).

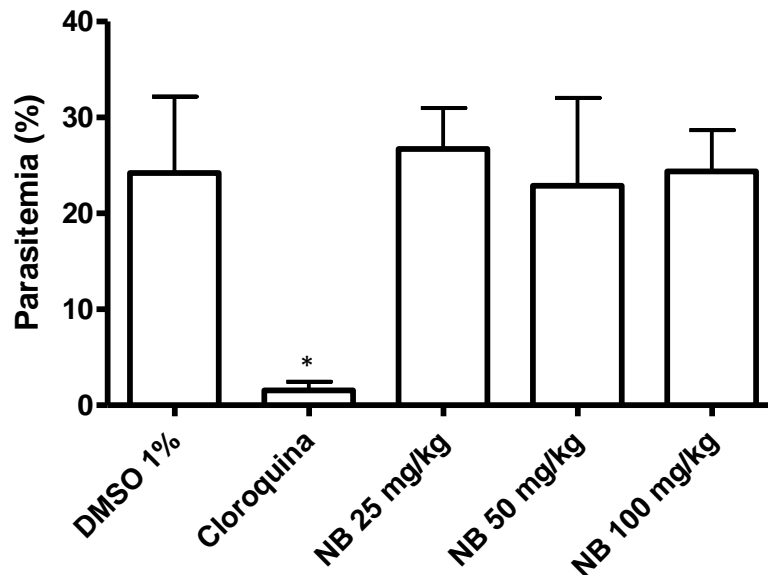


Figura 23 - Parasitemia média em camundongos infectados pelo *Plasmodium berghei* (ANKA). O tratamento foi realizado via oral por quatro dias consecutivos com 25, 50 e 100 mg/kg de extrato metanólico obtido a partir de caules de *N. brasiliensis* cultivada *in vivo*. O veículo utilizado para a diluição das amostras foi o DMSO 1% e como controle positivo foi utilizada a cloroquina (25 mg/kg). No quinto dia após a infecção, cortou-se as caudas dos animais e realizou-se o esfregaço em lâminas sendo estas posteriormente coradas e observadas em microscópio ótico no aumento de 100X. Os resultados expressam média  $\pm$  desvio padrão de dois experimentos independentes com cinco animais por amostra. Considerou-se significativa as diferenças representadas pelo asterisco onde  $p \leq 0,05$  em relação ao controle tratado com o veículo.

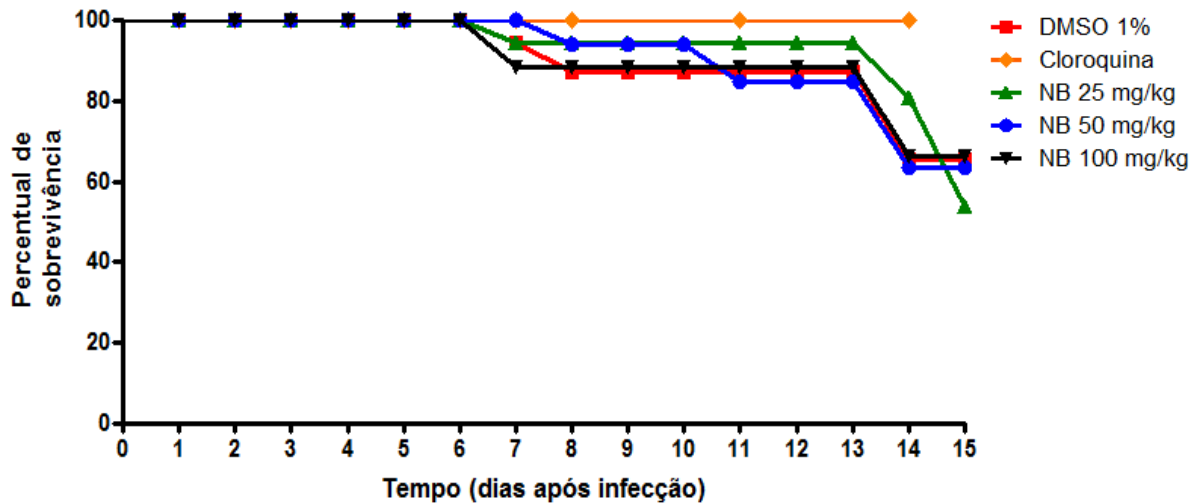


Figura 24 - Sobrevida dos animais tratados com extrato metanólico obtido a partir de caules de *N. brasiliensis* cultivada *in vivo*, durante 15 dias após a infecção com *P. berghei* ANKA. Gráfico representativo de um experimento independente.

Na avaliação da atividade antimalárica do extrato metanólico obtido biotecnologicamente através da cultura de raízes de *N. brasiliensis* a partir de explantes foliares, mantidos em meio sólido B5 suplementado com  $1.0 \text{ mg.L}^{-1}$ , não houve diferença significativa entre doses e o controle (Figura 25). Em relação à sobrevida, os animais começaram a morrer a partir do 7º dia, e nenhum se manteve vivo ao final de 15 dias (Figura 26).



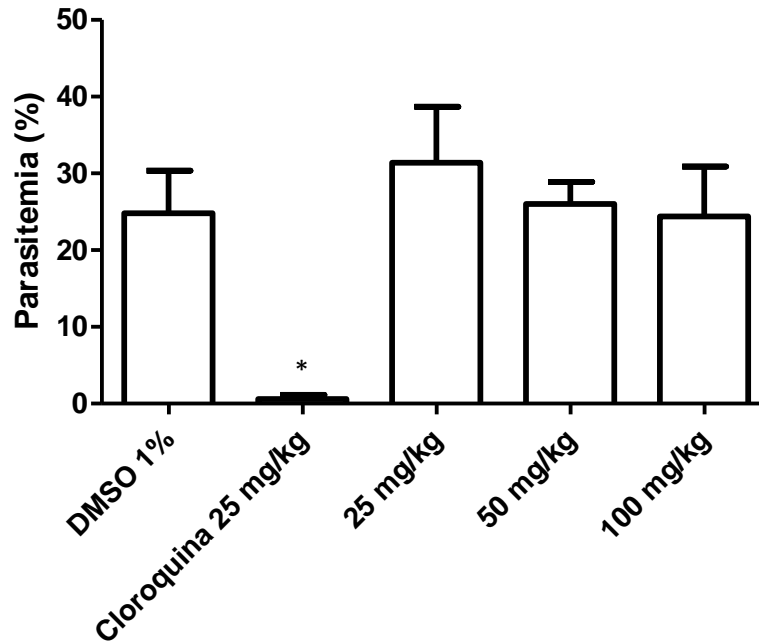


Figura 25 - Parasitemia média em camundongos infectados pelo *Plasmodium berghei* (ANKA). O tratamento foi realizado via oral por quatro dias consecutivos com 25, 50 e 100 mg/kg de extrato metanólico obtido a partir de raízes de *N. brasiliensis* cultivada *in vitro*. O veículo utilizado para a diluição das amostras foi o DMSO 1% e como controle positivo foi utilizada a cloroquina (25 mg/kg). No quinto dia após a infecção, cortou-se as caudas dos animais e realizou-se o esfregaço em lâminas sendo estas posteriormente coradas e observadas em microscópio ótico no aumento de 100X. Os resultados expressam média  $\pm$  desvio padrão de dois experimentos independentes com cinco animais por amostra. Considerou-se significativa as diferenças representadas pelo asterisco onde  $p \leq 0,05$  em relação ao controle tratado com o veículo.

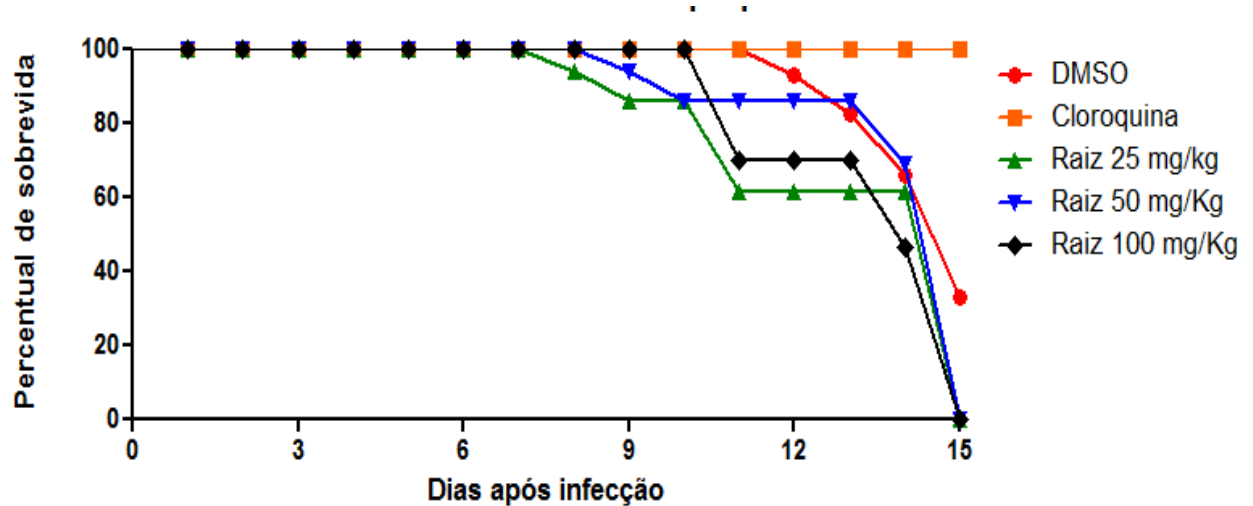


Figura 26 - Sobrevida dos animais tratados com extrato metanólico obtido a partir de raízes de *N. brasiliensis* cultivada *in vitro*, durante 15 dias após a infecção com *P. berghei* ANKA. Gráfico representativo de um experimento independente.

### 3.2.3 Testes *in vitro*

Os extratos brutos de folha, raiz e caule de *Norantea brasiliensis* foram administrados às culturas de células humanas infectadas com *P. falciparum* nas concentrações de 25, 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$  por 48 horas. Como controle positivo foi utilizado o fármaco padrão cloroquina, na concentração de 10  $\text{ng/mL}$ , e como controle negativo foi utilizado o meio RPMI adicionado de 10% de plasma. A avaliação da parasitemia se deu pela leitura da fluorescência, tendo como medida a unidade relativa de fluorescência (RFU).

Quando avaliada a atividade antimalárica de extratos obtidos a partir de folhas não houve diferença significativa entre as concentrações testadas em relação ao controle negativo embora haja uma tendência de aumento do efeito inibitório (Figura 27).

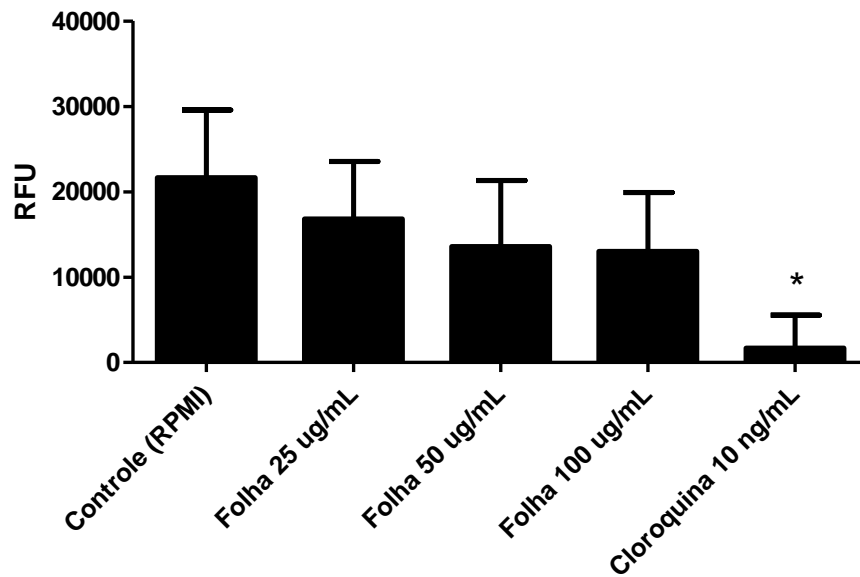


Figura 27 - Fluorescência relativa correspondente a proliferação de *Plasmodium falciparum* (cepa Haiti HUCFF) incubados com extrato metanólico obtido a partir de folhas de *N. brasiliensis* cultivada *in vivo*. Hemácias humanas parasitadas (0,5% e hematócrito de 2%) foram incubadas na presença (25, 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$ ) e ausência das amostras por 48 horas. Após o período de incubação, as células foram lisadas com tampão de lise de hemácias adicionado de sybr green. A fluorescência relativa foi adquirida em espectrofotômetro de fluorescência com comprimentos de onda de 485 nm para excitação e 535 nm de emissão com um cutoff de 530 nm. Os resultados expressam média  $\pm$  desvio padrão de cinco experimentos independentes com triplicatas, sendo significativamente as diferenças representados pelo asterisco ( $p \leq 0,05$ ).

Na avaliação da atividade antimalárica de extratos obtidos a partir de raízes, a concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$  apresentou diferença significativa quando comparada com as concentrações testadas e o controle negativo. Além disso, há uma tendência de aumento do efeito inibitório conforme o aumento da concentração do extrato (Figura 28).

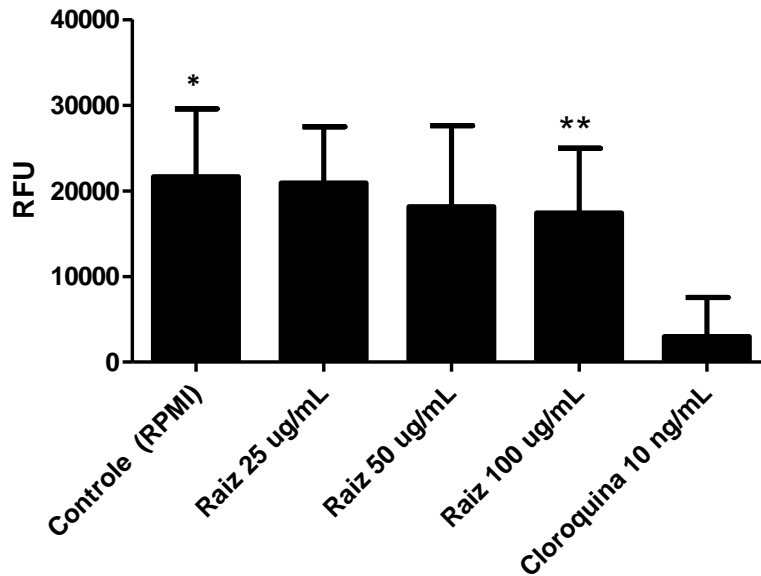


Figura 28 - Fluorescência relativa correspondente a proliferação de *Plasmodium falciparum* (cepa Haiti HUCFF) incubados com extrato metanólico obtido a partir de raízes de *N. brasiliensis* cultivada *in vivo*. Hemácias humanas parasitadas (0,5% e hematócrito de 2%) foram incubadas na presença (25, 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$ ) e ausência das amostras por 48 horas. Após o período de incubação, as células foram lisadas com tampão de lise de hemácias adicionado de sybr green. A fluorescência relativa foi adquirida em espectrofotômetro de fluorescência com comprimentos de onda de 485 nm para excitação e 535 nm de emissão com um cutoff de 530 nm. Os resultados expressam média  $\pm$  desvio padrão de cinco experimentos independentes com triplicatas, sendo significativamente as diferenças representados pelo asterisco ( $p \leq 0,05$ ).

Quando foi avaliada a atividade antimalárica *in vitro* de extratos obtidos a partir de caules de *N. brasiliensis*, não houve diferença significativa entre as concentrações testadas em relação e o controle negativo (Figura 29).

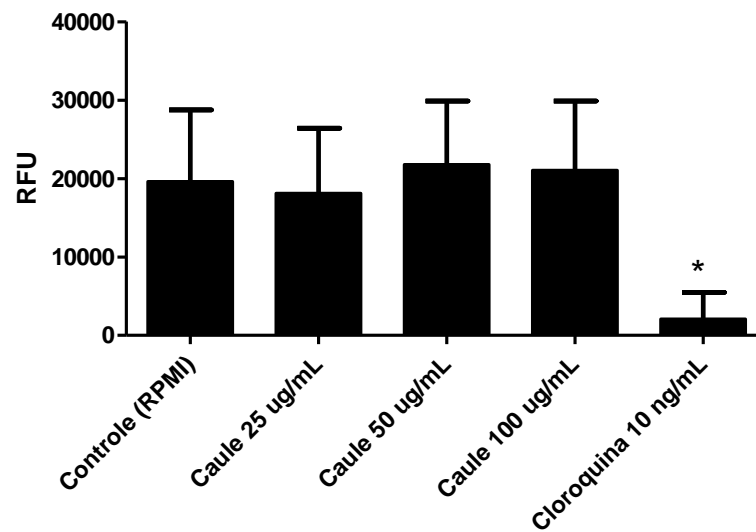


Figura 29 - Fluorescência relativa correspondente a proliferação de *Plasmodium falciparum* (cepa Haiti HUCFF) incubados com extrato metanólico obtido a partir de caules de *N. brasiliensis* cultivada *in vivo*. Hemácias humanas parasitadas (0,5% e hematócrito de 2%) foram incubadas na presença (25, 50 e 100 µg/mL) e ausência das amostras por 48 horas. Após o período de incubação, as células foram lisadas com tampão de lise de hemácias adicionado de sybr green. A fluorescência relativa foi adquirida em espectrofotômetro de fluorescência com comprimentos de onda de 485 nm para excitação e 535 nm de emissão com um cutoff de 530 nm. Os resultados expressam média ± desvio padrão de cinco experimentos independentes com triplicatas, sendo significativamente as diferenças representados pelo asterisco ( $p \leq 0,05$ ).

### 3.3 Teste de citotoxicidade

Os resultados do teste de citotoxicidade realizados com extratos metanólicos de *N. brasiliensis* apresentaram valores de  $CL_{50}$  acima de  $0,96 \text{ mg.mL}^{-1}$ .

Na comparação entre órgãos da planta mantida sob condições *in vivo*, o extrato bruto de raiz mostrou-se menos citotóxico, apresentando  $CL_{50}$  equivalente a  $1,35 \text{ mg.mL}^{-1}$ , quando comparado a extratos de caule e folha, que apresentaram valores iguais a  $0,96$  e  $0,98 \text{ mg.mL}^{-1}$ , respectivamente. Em relação ao material produzido *in vitro*, o extrato obtido através da cultura de raízes apresentou  $CL_{50} \square 1,50 \text{ mg.mL}^{-1}$  (Tabela 10).

Tabela 10 - Valores de concentração letal ( $CL_{50}$ ) de extratos metanólicos de *Norantea brasiliensis* cultivada *in vivo* e *in vitro*, determinado por teste de letalidade em *Artemia salina*.

Material testado	$CL_{50}$ (mg.mL <sup>-1</sup> )
<b>Planta cultivada <i>in vivo</i></b>	
Folha	0,98
Caule	0,96
Raiz	1,35
<b>Raízes obtidas <i>in vitro</i></b>	
	>1,50

### 3.4 Perfil fitoquímico

Os cromatogramas obtidos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao Detector de Arranjo de Diodos (CLAE/DAD), a partir de extrato de folhas, apresentaram sinais majoritários com valor de tempo de retenção igual a 27,4 minutos (n°8) (Figura 30a), cujos espectros característicos na região do ultravioleta (Figura 30b) foram relacionados à classe química dos flavonoides.

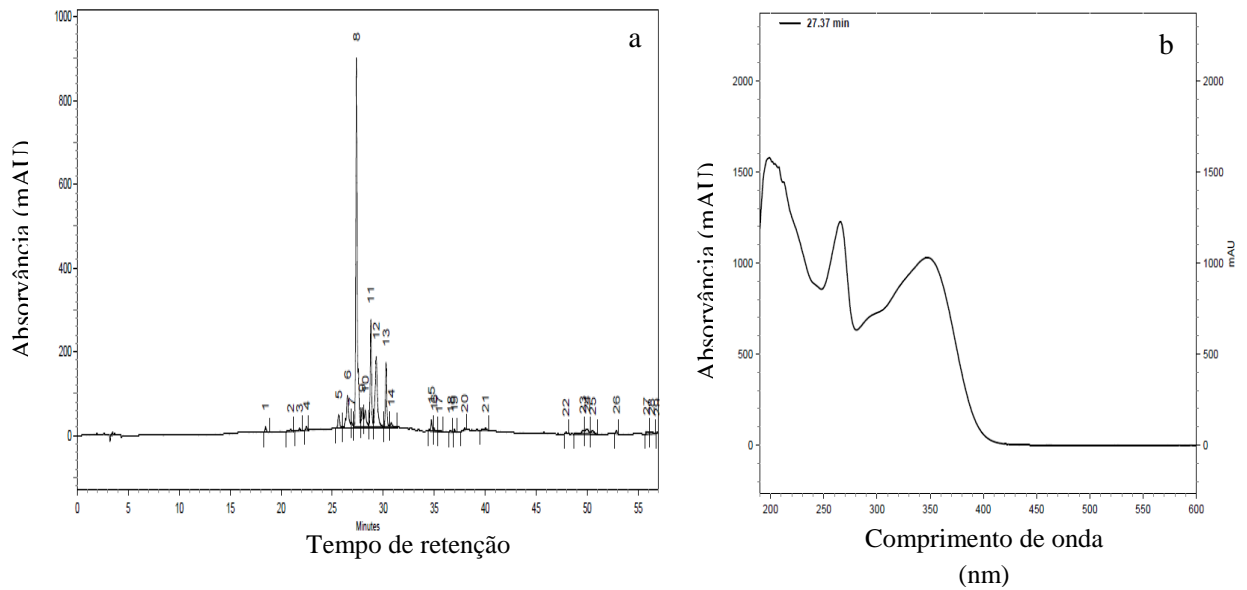


Figura 30 - Cromatograma obtido por CLAE/DAD, a partir de extrato bruto metanólico de folhas de *N.brasiliensis*

Legenda: (a) e espectro de absorção na região do ultravioleta (b).

Quando analisado o extrato metanólico de raízes, os cromatogramas obtidos apresentaram sinais majoritários com valores de tempo de retenção iguais a 18,49 e 29,41 minutos, (n<sup>o</sup> 2 e 14) (Figura 31a), seus espectros característicos na região do ultravioleta (Figura 31b) foram relacionados, a partir de 260 nm, a anel aromático funcionalizado, sugerindo a presença da classe química de fenilpropanoides.

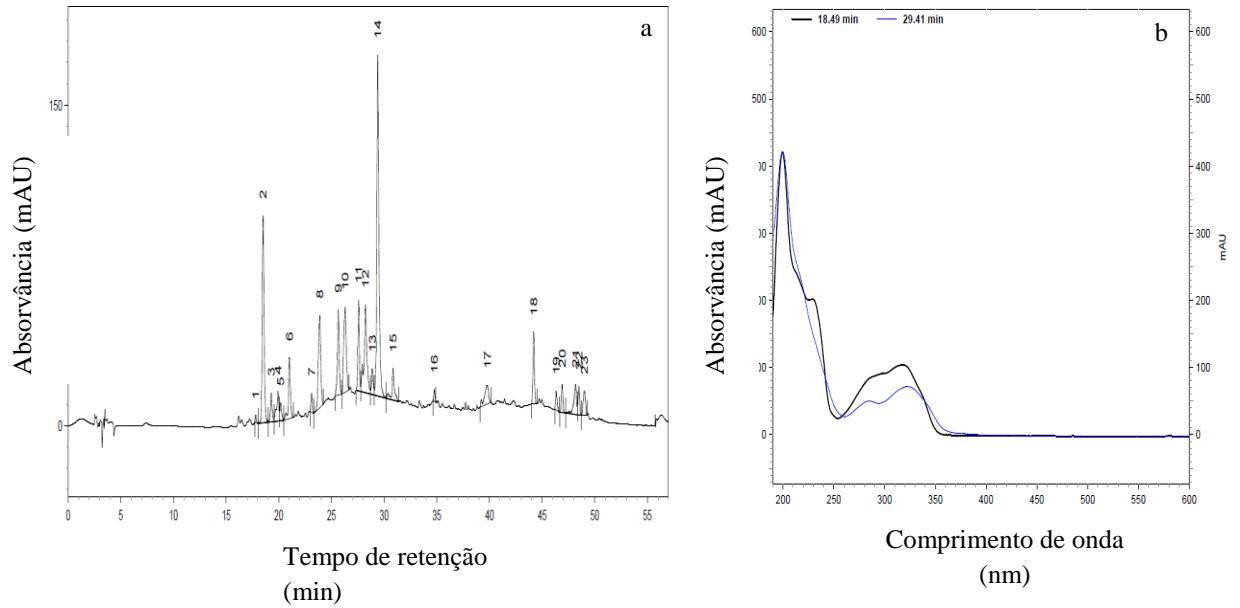


Figura 31 - Cromatograma obtido por CLAE/DAD, a partir de extrato bruto metanólico de Raízes de *N.brasiliensis*

Legenda: (a) e espectro de absorção na região do ultravioleta (b).

Os cromatogramas obtidos a partir de extrato de caules de *N. brasiliensis* apresentaram sinais majoritários com tempo de retenção iguais a 19,5 e 28,6 minutos (n<sup>o</sup>3 e 13) (Figura 32a), e espectros característicos na região do ultravioleta (Figura 32b) foram relacionados, a partir de 260 nm, a anel aromático funcionalizado, sugerindo também a presença da classe química de fenilpropanoides.



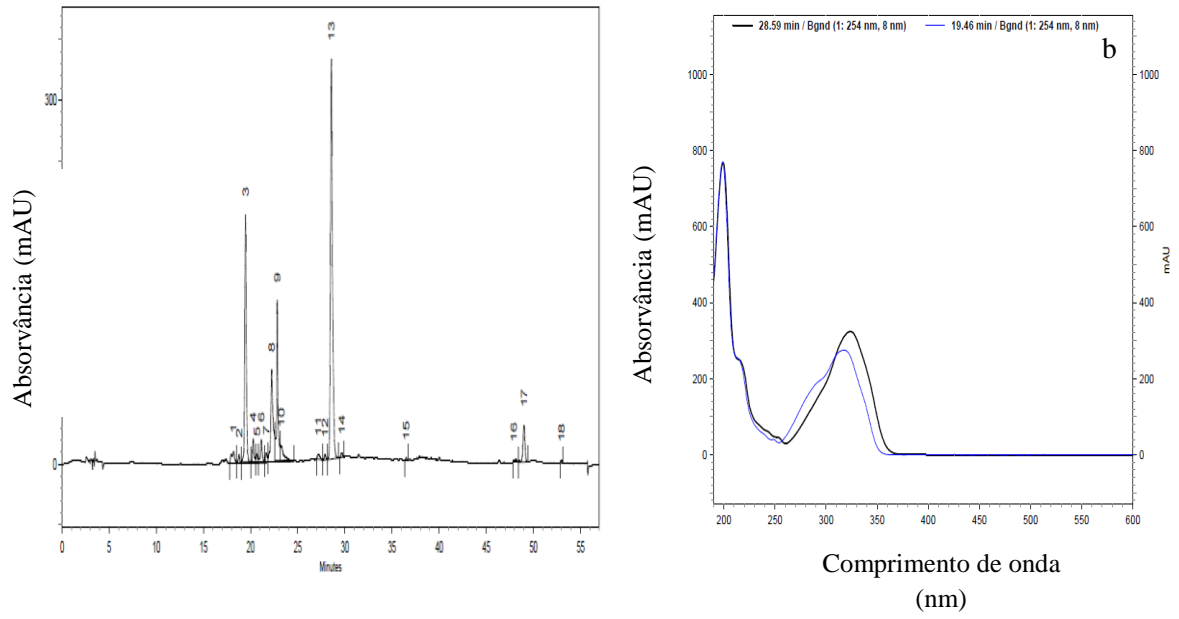


Figura 32 - Cromatograma obtido por CLAE/DAD, a partir de extrato bruto metanólico de caules de *N.brasiliensis*  
Legenda: (a) e espectro de absorção na região do ultravioleta (b).

## 4 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho em relação à produção *in vitro* de raízes são de grande relevância quando se pretende o estudo do potencial medicinal de uma espécie, sobretudo se a mesma insere-se na categoria de espécies ameaçadas, como é o caso de *N. brasiliensis*. A cultura de órgãos, principalmente de raízes, tem sido uma das técnicas mais utilizadas para a produção de muitas substâncias de interesse comercial e farmacológico (CHOI et al., 2005; LANGHANOVÁ et al., 2005; KARAPPUSAMY, 2009), considerando que vários estudos indicam as raízes como o órgão que concentra as mais altas taxas de substâncias bioativas (YANIV & BACHRACH, 2002). Ao longo dos últimos anos, muitos trabalhos têm indicado a cultura de células em suspensão como material biológico adequado à produção de metabólitos e aos estudos de vias biossintéticas. Porém, é necessária a produção de massas calogênicas para dar início a esses sistemas. No presente estudo os protocolos testados não foram favoráveis à produção de calos, mas as culturas visando à produção de raízes apresentaram boa resposta, sendo promissoras para o estabelecimento de um sistema de produção contínua de substâncias. As culturas de raízes têm sido consideradas uma boa alternativa para a produção de metabólitos, substituindo as suspensões celulares (BOURGAUD et al., 2001).

Muitos trabalhos indicam a produção de raízes pelo sistema *hairy root*, onde o explante é infectado com *Agrobacterium rhizogenes*. Entretanto, a vantagem da produção de raízes sem a necessidade de transformação pode ser constatada pela produção estável de substâncias bioativas, devido principalmente as facilidades no cultivo e a ausência de modificações no genoma, mantendo a fidelidade genética da planta (SIVAKUMAR, 2006). Por outro lado, nem sempre é possível o estabelecimento de uma cultura de raízes isoladas, tendo em vista uma possível dormência meristemática induzida ou senescência, relacionada ao tempo que as raízes permanecem crescendo *in vitro* (GEORGE, 2008).

Nos estudos de cultura de raízes desenvolvidos neste trabalho, foram obtidos resultados positivos sem a necessidade de transformação e as culturas de raízes isoladas mantiveram-se responsivas às condições de cultivo *in vitro*. Foram utilizados explantes radiculares, foliares e caulinares, inoculados em meio sólido e líquido suplementado com as auxinas AIA, AIB e ANA. O uso desses fitorreguladores, principalmente da classe das auxinas, tem sido indicado para induzir a produção de raízes em diversos trabalhos de cultura

*in vitro* (NANDAGOPAL & KUMARI, 2007; BASKARAN & JAYABALAN, 2009; GOEL et al., 2009; BAQUE et al., 2010; CUI et al., 2010).

Para o estabelecimento da cultura de raízes de *N. brasiliensis*, a suplementação com a auxina AIA não resultou em uma boa resposta rizogênica, independentemente da origem do material botânico e do explante utilizado. Porém, propiciou o desenvolvimento de brotos tanto em meio líquido quanto sólido na região das gemas axilares (Figuras 14, 15, 24 e 25), resposta que poderá ser otimizada visando à multiplicação de brotos axilares, uma das técnicas de micropropagação por organogênese direta (GEORGE & DEBERGH, 2008). A produção de brotos por organogênese direta pode ser interpretada como uma vantagem em certos aspectos quando comparada à formação de órgãos por meio indireto, passando pela fase de calo, uma vez que pode aumentar as chances de ocorrer variações somaclonais em plantas regeneradas indiretamente. Estas chances são minimizadas quando a organogênese ocorre através da forma direta (GANESHAN et al., 2006), sendo possível manter a fidelidade genética. O uso de auxinas mais potentes que o AIA, além de ampliar o potencial rizogênico, um dos efeitos biológicos marcantes desta classe hormonal, possivelmente potencializou o efeito endógeno deste fitorregulador, na supressão do desenvolvimento das gemas axilares pela presença de auxina endógena transportada basipetamente, o que normalmente é verificado em plantas intactas num evento fisiológico denominado dominância apical (TAIZ & ZEIGER, 2010).

Experimentos com a auxina ANA resultaram em altas taxas de produção de raízes a partir de explantes foliares e caulinares em meio sólido, oriundos de plantas germinadas *in vitro*, e a partir de explantes foliares de plantas propagadas *in vitro* (Figuras 12, 22 e 25). O mesmo foi evidenciado em outros trabalhos de cultura de raízes (SINAVESAN & JEONG, 2009; PANDEY, 2010), sugerindo que a resposta está diretamente relacionada ao fitorregulador utilizado, uma vez que as auxinas ANA e AIB têm se mostrado mais eficientes que a auxina AIA para este tipo de resposta morfogênica (NANDAGOPAL & KUMARI, 2007; BAQUE et al., 2010).

Segundo Grattapaglia & Machado (1998), as auxinas estão presentes em mais de 80% dos meios utilizados visando à produção de raízes, podendo ser adicionadas sozinhas ou em combinação. Nesse contexto, Vivanco & Flores (2000) dizem que as auxinas sintéticas, tais como ácido indolbutírico (AIB) e ácido naftaleno acético (ANA) são mais efetivas do que ácido indolacético (AIA) para a produção de raízes, corroborando os resultados apresentados no presente trabalho. Porém, outras auxinas também têm sido utilizadas em trabalhos de

rizogênese *in vitro* como o 2,4-diclorofenolacético (2,4-D), o picloram, o ácido beta-naftoxiacético (ANOA) e o ácido p-cloroenoxiacético (ApCFA) (SOUZA & PEREIRA, 2007). Contudo, de modo geral, estas substâncias estimulam a formação de calos, prejudicando o enraizamento (SOUZA & PEREIRA, 2007).

Considerando que diversos são os fatores que podem influenciar o processo de formação de raízes *in vitro* o presente trabalho avaliou, não só a resposta frente a diferentes tipos e concentrações de auxinas, mas também o tipo de explante, sua origem e o meio de cultura.

Na avaliação do tipo de explante, os órgãos que melhor favoreceram a produção de raízes foram folha e caule. Porém, avaliando os valores de peso fresco e seco, explantes foliares mostraram-se mais adequados ao acúmulo de biomassa (Tabelas 5 e 8). Diversos trabalhos têm sugerido essas duas fontes de explantes para início da produção *in vitro* de raízes (NANDAGOPAL & KUMARI, 2007; MARTIN et al., 2008; SIVANESAN & JEONG, 2009; KWAK et al., 2009; KESARI et al., 2009; BAQUE et al., 2010, CUI et al., 2010). O uso de folhas para início das culturas de tecido vegetais apresenta vantagens por serem órgãos que normalmente oferecem boa quantidade de segmentos para inoculação (explantes), menor taxa de contaminação, quando comparadas às raízes, e são consideradas importante fonte de metabólitos secundários (NANDAGOPAL & KUMARI, 2007; ; SIVANESAN & JEONG, 2009).

Quando avaliada a origem dos explantes, as plantas propagadas *in vitro* mantidas em estoque mostraram-se menos eficientes à resposta rizogênica do que as plantas germinadas *in vitro*, que eram mais jovens (dois meses de idade). A idade das plantas matrizes, sua origem e seu estágio de desenvolvimento também são aspectos importantes a serem considerados na resposta morfogênica. A utilização de tecidos jovens tem sido indicada como melhor fonte de explante, uma vez que este tipo de material oferece a vantagem de pronta capacidade de crescimento e de resposta à aplicação exógena de reguladores de crescimento (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998; MONTARROYOS, 2000).

Tanto nos experimentos de calogênese quanto nos de cultura de raízes a partir de plantas propagadas *in vitro*, foi evidenciada, logo no início das culturas, a produção de uma substância de coloração laranja. Algumas amostras foram coletadas e inoculadas em meio para crescimento de microorganismos, a fim de descartar a possibilidade de contaminação, o que ocorreu após o período de incubação e análise. Após análise em espectrofotômetro, a

substância foi identificada como pertencente à classe dos carotenoides (Figura 5). Ao que tudo indica, o aparecimento do carotenoide comprometeu o desenvolvimento de calos e raízes. Possivelmente, outra rota metabólica foi ativada no material propagado *in vitro*, visto que nos experimentos em que o carotenóide foi produzido, houve uma diminuição e/ou inibição do crescimento das culturas. O aparecimento de carotenoides em culturas iniciadas com plantas propagadas *in vitro* foi também observado em culturas de calos de *Cleome spinosa* (ALBARELLO, 2005) que desconsiderou a possibilidade de contaminação tendo em vista vários testes realizados para este fim e relacionou a produção da substância à condição de estresse que o material propagado e mantido *in vitro* está sujeito. Em condições naturais, estresses tanto de natureza biótica quanto abiótica têm sido relacionados à produção de metabólitos secundários (GOBBO-NETO & LOPES, 2007). O mesmo pode ser observado sob condições de cultivo *in vitro* que é considerada por si só, uma situação estressante (LATTANZIO et al., 2009; KUMAR et al., 2009; VELLOSO et al., 2009). Nesse contexto, a produção de carotenoides *in vitro* também pode ser relacionada à condição de estresse. Outros fatores têm sido citados por influenciarem a produção de metabólitos vegetais, como por exemplo, a origem do material botânico e seu tempo em cultura (PASKA et al., 1999; ZHAO et al., 2001; FIGUEIREDO et al., 2003).

Pela avaliação do tipo de meio utilizado e a resposta morfogênica obtida, foi possível observar que o meio sólido foi mais eficiente para a rizogênese, uma vez que foi evidenciada alta taxa de oxidação dos explantes em meio líquido. O uso de meio líquido tem sido indicado para a cultura de raízes, segundo George (2008), uma vez que o crescimento desses órgãos seria mais lento em meio sólido. Porém, a disponibilidade de oxigênio em meio sólido seria reduzida, o que pode estar relacionado ao menor grau de oxidação dos explantes nessa condição.

Experimentos usando a auxina AIA em meio líquido, mostrou-se favorável à produção de brotos (Figuras 14, 15, 24 e 25). Considerada fraca frente a outras auxinas, quando adicionada ao meio de cultura sólido, sua eficiência em meio líquido parece ter sido ampliada, provavelmente, devido ao aumento da disponibilidade e absorção da substância pelos explantes aumentando também a sua atuação. Trabalhos utilizando meio líquido e a auxina AIA para a produção de brotos têm sido descritos na literatura para algumas espécies (JARDIM et al., 2010; CAMOLESI et al., 2010), confirmando sua atuação em processos morfogênicos *in vitro*.

Neste trabalho foi avaliada pela primeira vez a propriedade antimalárica de extratos de *Norantea brasiliensis*. Foram utilizadas duas metodologias para detecção do potencial antimalárico: uma envolvendo estudos *in vivo* usando camundongos, e outra com modelo *in vitro* utilizando cepa de *Plasmodium falciparum*. A relevância dessas investigações está pautada no fato de a malária ainda ser uma doença que acarreta sérios problemas à saúde pública dos países onde a doença ocorre. As estratégias de controle não eficazes e a falta de uma vacina repercute em altas taxas de mortalidade em todo o mundo. Além disso, diversas cepas, principalmente do *Plasmodium falciparum*, vêm se tornando multi-resistentes às drogas antimaláricas (OMS, 2008). Sendo assim, há uma incessante busca por novas drogas com potencial antimalárico, inclusive de origem vegetal.

No presente estudo foram testadas três concentrações diferentes de extratos brutos para os ensaios *in vivo* (25, 50 e 100 mg/kg), onde os animais receberam, por via oral, doses diárias das amostras. Somente o extrato de raízes de plantas cultivadas *in vivo*, na concentração de 50 mg/kg foi capaz de reduzir a parasitemia, em cerca de 33,5% quando comparado ao controle negativo (Figura 28), permitindo ainda que os animais tratados com essa concentração apresentassem maior sobrevivência ao final de 15 dias (Figura 29), sugerindo um efeito farmacológico mais prolongado. Estudos realizados com extratos fracionados de *Ouratea nitida* e *Pouteria venosa*, administrados em concentrações superiores a 250 mg/kg, indicaram a redução da parasitemia em taxa superior a 40% (ESTEVAM et al., 2005; MONTENEGRO et al., 2006), sugerindo que o fracionamento dos extratos e identificação das moléculas é de suma importância para direcionar os testes com moléculas bioativas já conhecidas ou não, que apresentem atividade antimalárica. Os testes *in vivo* possuem a vantagem de possibilitar as interações entre parasita e hospedeiro, aproximando das situações clínicas e epidemiológicas reais. No entanto, existem problemas que podem limitar a sua utilização, como por exemplo, dificuldades burocráticas e éticas para o uso de animais, problemas de reinfecção (CRAVO & ROSARIO, 2002) e perdas na biodisponibilidade, com a interferência na distribuição e absorção da droga, que precisa passar pela mucosa gastrointestinal e atravessar o endotélio das células da parede capilar, até que alcance a corrente sanguínea (ZANINI & OGA, 1979). Essas perdas podem ter ocorrido nos extratos de folhas e raízes de *N. brasiliensis* cultivada *in vivo* e de raízes obtidas biotecnologicamente, que não apresentaram efeito inibitório significativo frente ao controle. Nesse caso, uma solução para evitar a perda de substâncias, ao longo do corpo do animal, pode ser a inoculação dos extratos por via subcutânea, onde a velocidade de dissolução ocorre de forma

mais rápida, ocasionando maior absorção e metabolização da droga pelo organismo, gerando o efeito terapêutico esperado (ZANINI & OGA, 1979).

Testes *in vitro* aparecem também como opção para avaliar a atividade antimalárica, apresentando a vantagem de os parasitas serem colocados em incubação, em contato com a célula e expostos a doses precisas do extrato, o que permite observar o grau de inibição de crescimento e/ou morte parasitária, refletindo o grau de susceptibilidade dos parasitas a um determinado fármaco e a uma determinada concentração. Porém, também apresenta algumas desvantagens, como reprodutibilidade dos resultados e ausência de uma correlação total com a situação *in vivo* (CRAVO & ROSARIO, 2002). Dessa forma é importante que os dois métodos sejam avaliados, com vistas à complementaridade de informações.

Nos testes *in vitro* com *N. brasiliensis*, o extrato de raízes de planta cultivada *in vivo* apresentou redução da parasitemia na concentração de 100 µg/mL quando comparada ao controle (Figura 37). Além disso, há uma tendência de redução da parasitemia conforme o aumento da concentração testada, sugerindo que experimentos com doses superiores possam apresentar maior atividade antimalárica.

De modo geral, os resultados obtidos nos experimentos realizados com *Norantea brasiliensis* sugerem que as substâncias bioativas para atividade antimalárica encontram-se nas raízes. Nesse sentido, a produção de metabólitos *in vitro* a partir de culturas de raízes pode ser muito vantajosa. Primeiramente, porque muitas vezes as moléculas de interesse estão presentes em órgãos específicos e em baixas concentrações, o que dificulta a exploração do material cultivado em condições naturais, sobretudo se é uma espécie em situação de risco de extinção. Por outro lado, a quantidade de material botânico pode não ser suficiente para atender às pesquisas científicas. Além do fato de que determinadas partes da planta consideradas medicinais têm sido exploradas como resultado no extrativismo de forma não planejada, o que pode levar ao desaparecimento de germoplasma de interesse cujo potencial farmacológico não foi sequer estudado (FRANÇA, 2010). Nesse sentido, quando o cultivo convencional é inviável ou insuficiente, a cultura de tecidos vegetais se apresenta como uma alternativa importante, viabilizando a produção vegetal em larga escala, bem como a síntese controlada de moléculas de interesse (KARUPPUSAMY, 2009), sem a necessidade de retirada contínua do material botânico encontrado na natureza. O fato de os metabólitos de interesse se concentrarem nas raízes, reforça o investimento neste tipo de sistema de cultivo *in vitro*.

As substâncias bioativas de origem vegetal, apesar da crença popular de que “o que é natural não faz mal” podem ser tóxicas ao organismo (BEDNARCZUK et al., 2010). Segundo dados do SINITOX (Sistema Nacional de Informações Tóxico Farmacológicas) do ano de 2008, no Brasil já foram registrados 85.925 casos de intoxicação por uso indevido de plantas e desses, 441 foram a óbito. Por isso faz-se necessária a avaliação da toxicidade dos extratos, quando se pretende a indicação do potencial medicinal de uma planta.

As normas éticas internacionais recomendam o uso criterioso de animais para pesquisas laboratoriais e sugere reflexão da validade dos seus resultados e o desenvolvimento de métodos alternativos (REZENDE et al., 2008). O bioensaio com artêmia salina é um teste que vem sendo comumente utilizado em trabalhos científicos para avaliação prévia de extratos com potencial atividade biológica por se constituir em uma técnica rápida e de baixo custo (SIQUEIRA et al., 1998; ZUQUE et al., 2004), que avalia a toxicidade do extrato vegetal em função da observação da dose letal a 50% da população de náuplios de artêmias contida em tubo de ensaio, representado pela  $CL_{50}$ .

Segundo DOLABELLA (1997), extratos com concentração letal menores que  $0,80 \text{ mg.mL}^{-1}$ , são considerado altamente tóxicos; entre  $0,80 \text{ mg.mL}^{-1}$  e  $0,250 \text{ mg.mL}^{-1}$ , moderadamente tóxicos e  $CL_{50}$  acima de  $0,250 \text{ mg.mL}^{-1}$ , baixa toxicidade ou não tóxico. Além disso, segundo Meyer e colaboradores (1982), valores acima de  $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$  são considerados bioativos.

Nos testes com *N. brasiliensis*, as concentrações letais ( $CL_{50}$ ) das amostras oriundas de plantas cultivadas *in vivo* foram de 1,35; 0,98 e 0,96  $\text{mg.mL}^{-1}$ , para extrato de raízes, folhas e caules, respectivamente (Tabela10). Em relação ao material produzido *in vitro*, o extrato obtido através da cultura de raízes apresentou  $CL_{50} > 1,50 \text{ mg.mL}^{-1}$  (Tabela10). Do exposto, podemos inferir que os extratos de *N. brasiliensis*, tanto cultivada *in vivo* quanto *in vitro*, são considerados não tóxicos.

As plantas contêm inúmeros constituintes, e seus extratos, quando testados, podem apresentar efeitos devido a seus princípios ativos relacionados à presença de compostos de diversas classes (MACIEL et al., 2002). Por isso, a análise da composição química das plantas propicia a identificação e descoberta de novas moléculas com interesse medicinal.

Nas análises por CLAE/DAD, as composições químicas dos extratos brutos de *Norantea brasiliensis* cultivados *in vivo*, revelaram a presença de flavonoides (em folhas)



(Figura 39) e fenilpropanoides (em raízes e caules) (Figuras 40 e 41), como componentes majoritários nas amostras.

Compostos derivados de flavonoides são relacionados à atividade antimalárica em diversos estudos *in vitro* com o *Plasmodium falciparum* (VALLA et al., 2006; GRUPTA et al., 2010). Paralelamente, a presença de fenilpropanoides em plantas tem sido associada a propriedades inseticidas (SIMAS et al., 2004; MORAIS et al., 2006). Segundo Florão (2006), sua função envolve sinais de comunicação química no reino vegetal e atuam como armas de defesa química contra o reino animal. Nesse sentido, sugere-se que a espécie estudada no presente trabalho pode ser avaliada quanto a sua propriedade inseticida.

Os resultados obtidos visando ao estabelecimento de um sistema de cultura de raízes *in vitro* e em relação ao indicativo do potencial antimalárico em extratos de raízes de *N. brasiliensis*, nos incentivam a um maior investimento nessa técnica da cultura de tecidos, objetivando a produção de substâncias bioativas e o fracionamento dos extratos a fim de direcionar a produção de moléculas de interesse visando à otimização dos resultados para atividade antimalárica, bem como a avaliação de outras atividades biológicas com a espécie.

## 5 CONCLUSÕES

- A cultura de raízes foi o sistema *in vitro* que apresentou melhores respostas para ser utilizado como fonte de metabólitos produzidos biotecnologicamente;
- Os fitorreguladores utilizados e as demais condições testadas visando à calogênese não favoreceram a produção de calos, exigindo novas avaliações para o uso desta técnica;
- A suplementação com o fitorregulador AIA em meio líquido propiciou o desenvolvimento de brotos axilares;
- O uso do fitorregulador ANA em meio sólido se mostrou mais adequado para o estabelecimento das culturas de raízes a partir de segmentos foliares e caulinares;
- O uso de folhas como explantes promoveu a melhor produção de biomassa nas culturas de raízes;
- O extrato metanólico de *N. brasiliensis* obtido a partir de raízes de plantas cultivadas sob condições *in vivo* exibiu potencial para atividade antimalárica;
- O bioensaio com *Artemia salina* revelou a baixa toxicidade dos extratos de *N. brasiliensis* cultivada sob condições *in vivo* e *in vitro*.

## REFERÊNCIAS

- AGRA, M.F. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacologia**, v. 18, p. 472-508, 2008.
- AGRIPINO, D.G.; LIMA, M.E.L.; SILVA, M.R.; MEDA, C.I.; BOLZANI, V.S.; CORDEIRO, I.; YOUNG, M.C.M.; MORENO, P.R.H. Screening of brazilian plants for antimicrobial and DNA-damaging activities.I. Atlantic rain forest . Ecological Station Juréia-Itatins. **Biota Neotropica**, v. 4, n. 2, p. 1-15, 2004.
- ALBARELLO, N. **Aplicação de métodos biotecnológicos para estudos fitoquímicos e farmacológicos de *Cleome spinosa* Jacq. (Capparaceae)**. Tese (Doutorado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2005.
- AMARA, A.A.; EL-MASRY, M.H.; BOGDADY, H.H. Plant crude extracts could be the solution: extracts showing *in vivo* antitumorigenic activity. **Pakistan Journal of Pharmacology Science**. v.21, n. 2, p. 159-171, 2008.
- AMINO, R.; THIBERGE, S.; MARTIN, B.; CELLI, S.; SHORTE, S.; FRISCHNECHT, F.; MÉNARD, R. Quantitative imaging of *Plasmodium* transmission from mosquito mammal. **NATURE**, p. 1-5, 2006.
- ANDRADE-NETO, V.F.; BRANDÃO, M.G.L.; NOGUEIRA, F.; ROSÁRIO, V.E.; KRETTLI, A.U. *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke (Rhamnaceae), a medicinal plant used to prevent malaria in the Amazon Region, hampers the development of *Plasmodium berghei* sporozoites. **International Journal for Parasitology**, v. 38, p. 1505-1511, 2008.
- ANDRADE-NETO, F.V.F.; POHLIT, A.M.; PINTO, A.C.S.; SILVA, E.C.C.; NOGUEIRA, K.L.; MELO, M.R.S.; HENRIQUE, M.C.; AMORIM, R.C.N.; SILVA, L.F.R.; COSTA, M.R.F.; NUNOMURA, R.C.S.; NUNOMURA, S.M.; ALECRIM, W.D.; ALECRIM, M.G.C.; CHAVES, F.C.M.; VIEIRA, P.P.R. *In vitro* inhibition of *Plasmodium falciparum* by substances isolated from Amazonian antimalarial plants. **Memória Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n 3, p. 359-365, 2007.
- BARROS, A.A.M.; Vegetação vascular litorânea da Lagoa de Jacarepiá, Saquarema, Rio de Janeiro, Brasil. **Rodriguésia**, v. 60, n.1, p. 97-110, 2009.
- BARROSO, G.M. Marcgraviaceae. In: **Sistemática de Angiospermas do Brasil**. Viçosa. Imp. Univ. F.V, v. 1, p. 137-138, 1978.
- BASKARAN, P.; JAYABALAN, N. Psoralen production in hairy roots and adventitious roots cultures of *Psoralea coryfolia*. **Biotechnology Lett**, n. 31, p. 1073-1077, 2009.
- BATISTA, R.; JUNIOR, A.J.S.; OLIVEIRA, A.B. Plant-derived antimalarial agents: new leads and efficient phytomedicines. Part II. Non-alkaloidal natural product. **Molecules**, v. 14, p. 3037-3072, 2009.
- BAQUE, M.D. A.; HAHN, E.; PAEK, K. Growth, secondary metabolite production and antioxidant enzyme response of *Morinda citrifolia* adventitious root as affected by auxin and cytokinin. **Plant Biotechnology Report**, v. 4, p. 109-116, 2010.

BEDNARCZUK, V.O; VERDAM, M.C.S ; MIGUEL, M.D ; MIGUEL, O.G. Tests *in vitro* and *in vivo* used in the toxicological screening of natural products. **Visão Acadêmica**, v.11, n.2, p. 43-50, 2010.

BOURGAUD, F.; GRAVOT, A.; MILESI, S.; GONTIER, E. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. **Plant Science**, n. 161, p. 839-851, 2001.

CAMARGO, E.P. Malária, maleita, paludismo. Endemias/ artigos, 2003.

CAMOLESI, M.R.; FARIA, R.T.; NEVES, C.S.V.J.; MARTINS, A.N. Volume do frasco e consistência do meio de cultura na multiplicação *in vitro* da bananeira 'Maçã'. **Ciência Rural**, v. 40, n.2, p. 255-260, 2010.

CARRILLO-ROSARIO, T.; RAMÍREZ, A.D. Actividad antimalárica de extractos crudos de plantas em ratones infectados con *Plasmodium berghei*. **Revista de la Facultad de Farmacia**, v. 47, n 1, 2005.

CARVALHO, A.C.B.; BALBINO, E.E.; MACIEL, A.; PERFEITO, J.P.S. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 314-319, 2008.

CHOI, S. M.; SON, S. H.; YUN, S. R.; KWON, O. W.; SEON, J. H.; PAEK, K. -Y. Pilotscale culture of adventitious roots of *ginseng* in a bioreactor system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 62, p. 187-193, 2000.

CHOI, D.; JUNG, J.; HA, Y.I.; PARK, H.; IN, D.S.; CHUNG, H.; LIU, J.R. Analysis of transcripts in methyl jasmonate-treated ginseng hairy roots to identify genes involved in the biosynthesis of ginsenosides and other secondary metabolites. **Plant Cell Reports**, v. 23, p. 557-566, 2005.

CONSOLI, R. A. G. B. & LOURENÇO DE OLIVEIRA, R. **Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil**, Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, p. 190-196, 1994.

COURA, J. R.; SUAREZ-MUTIS, M.; LADEIA-ANDRADE. S. A new challenge for malaria control in Brazil: asymptomatic *Plasmodium infection* - A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n 3, p. 229-237, 2006.

CRAVO, M.P.; ROSÁRIO, V.E. Aspectos de genética molecular da resistência aos fármacos antimaláricos. **Boletim Biotecnologia**, v. 73, p. 2-8, 2002.

CUI, X. -H.; CHAKRABARTY, D.; LEE, E. J.; PAEK, K. -Y. Production of adventitious roots and secondary metabolites by *Hypericum perforatum* L. in a bioreactor. **Biology Resource Technology**, v. 101, n. 12, p. 4708-4716, 2010.

DOLABELA, M.F. **Triagem *in vitro* para atividade antitumoral e anti-Tripanossoma cruzi de extratos vegetais, produtos naturais e substâncias sintéticas** (Dissertação de Mestrado –UFMG). 128p, 1997.

ESTEVAM, C.S.; OLIVEIRA, F.M.; CONSERVA, L.M.; LIMA, L.F.C.O.; BARROS, E.C.P.; BARROS, A.C.P.; ROCHA, E.M.M.; ANDRADE, E.H.A. Constituintes químicos e avaliação preliminar *in vivo* da atividade antimalárica de *Ouratea nitida* Aubl (Ochnaceae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 15, n. 3, p. 195-198, 2005.

FERNANDES, N.E.P.; CRAVO, P.; ROSÁRIO, V.E. Resistência à sulfadoxina-pirimetamina em Maputo, Moçambique: presença de mutações nos genes *dhfr* e *dhps* do *Plasmodium falciparum*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 4, p. 447-450, 2007.

FERREIRA, G. Estudo taxonômico das espécies brasileiras do gênero *Norantea* Aublet (Marcgraviaceae). **Arquivo do Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, v. 33, p. 9-53, 1995.

FIGUEIREDO, S.F.L.; VIANA, V.R.C.; TRUGO, L.C.; KAPLAN, M.A.C. *Rollinia mucosa* (Jacq.) Baill.: establishment of callus culture and lignan production. **Rev Cubana Plant Med**, v.8, 2003.

FINNEY, D.J. **Probit analysis**. 3rd ed. Cambridge University Press. Cambridge, 1971.

FLORÃO, A. **Avaliação das atividades biológicas de óleos essenciais de quatro espécies de *Baccharis*, Asteraceae**. Tese (Mestrado). Universidade Federal do Paraná, 2006.

FRANÇA, S.C. Abordagens biotecnológicas para a obtenção de substâncias ativas. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMAN, G.; PALAZZO DE MELLO, J.C.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 5rd ed. da UFSC, 2003. p.123-146.

FRANÇA, T.C.C.; SANTOS, M.G.; FIGUEROA-VILLAR, J.D. Malária: aspectos históricos e quimioterapia. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p.1271-1278, 2008.

GAMBORG, O.L., MILLER, R.A., OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, v. 50, p.151-158, 1968.

GANESHAN, S.; CODAPARAMBIL, S.; BAGA, M.; FOWLER, D.B.; UCL, P.; ROSSNAGEL, B.G.; CHIBBAR, R.N. *In vitro* regeneration of cereals based on multiple shoot induction from matura embryos in response to thidiazuron. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 85, p. 63-73, 2006.

GEORGE, E. F. Plant Tissue Culture Procedure - Background. In: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. -J. (Ed.) **Plant Propagation by Tissue Culture**, 3rd ed. The Netherlands: Springer, 2008, p. 1-28.

GEORGE, E. F.; DEBERGH, P. C. Micropropagation: uses and methods. In: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. -J. (Ed.) **Plant Propagation by Tissue Culture**, 3rd ed. The Netherlands: Springer, 2008, p. 29-65.

GOBBO-NETO, L. & LOPES, N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GOEL, M.K.; KUKREJA, A.K.; BISHT, N.S. *In vitro* manipulations in St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) for incessant and scale up micropropagation using adventitious roots in liquid medium and assessment of clonal fidelity using RAPD analysis. **Plant Cell Tissue, Organ and Culture**, n. 96, p. 1-9, 2009.

GOLENSER, J.; WAKNINE, J.H.; KRUGLIAK, M.; HUNT, N.H.; GRAU, G.E. Current perspectives on the mechanism of action of artemisinins. **International Journal Parasitology**, v. 36, n. 14, p. 1427-1441, 2006.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI / Embrapa-CNPq, v.1, p.43-76, 1998.

GRUPTA, A.K.; SAXENA, S.; SAXENA, M. Integrated ligand and structure based studies of flavonoids as fatty acid biosynthesis inhibitors of *Plasmodium falciparum*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, p. 4779-4781, 2010.

GUERRA, M.P.; VESCO, L.L.D.; PESCADOR, R. SCHUELTER, A.R.; NODARI, R.O. Estabelecimento de um protocolo regenerativo para a micropropagação do abacaxizeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, n. 9, p. 1557-1563, 1999.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drug of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, p. 1-93, 2006.

HAY, S. I.; GUERRA, C. A; TATEM, A. J.; NOOR, A. M.; SNOW, R. W. The global distribution and population at risk of malaria: past, present, and future. **Lancet**, v. 4, p. 327-336, 2004.

JACHAK, S.M. & SAKLANI, A. Challenges and opportunities in drug discovery from plants. **Current Science**, v. 92, n. 9, 2007.

JARDIM, L.S.; SAMPAIO, P.T.B.; COSTA, S.S.; GONÇALVES, C.Q.B.; BRANDÃO, H.L.M. Efeito de diferentes reguladores de crescimento na regeneração *in vitro* de pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke). **Acta Amazonica**, v. 40, n. 2, p. 275-280, 2010.

KARUPPUSAMY, S. A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by *in vitro* tissue, organ and cell cultures. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 3, n. 13, p. 1222-1239, 2009.

KESARI, V.; KRISHNAMACHARI, A.; RANGAN, L. Effect of auxins on adventitious rooting from stem cuttings of candidate plus tree *Pongamia pinnata* (L.), a potential biodiesel plant. **Trees**, v. 23, p. 597-604, 2009.

KUMAR, U.; SINGH, I.; VIMALA, P.; VIMALA, Y. *In vitro* salt stress induced production of gymnemic acid in callus cultures of *Gymnema sylvestre* R.Br. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 31, p. 4904-4909, 2010.

KWAK, M.; KIM, I.; KIM, S.; HAN, T. Effects of brassinolide with naphthalene acetic acid on the formation of adventitious roots, trichome-like roots and calli from cultured tobacco leaf segments, and the expression patterns of *CNT103*. **Journal of Plant Biology**, v. 52, p.511-517, 2009.

LANGHANSOVÁ, L.; MARŠÍK, P.; VANĚK, T. Production of saponins from *Panax ginseng* suspension and adventitious root cultures. **Biologia Plantarum**, v. 49, n. 3, p. 463-465, 2005.

LATTANZIO, V.; CARDINALI, A.; RUTA, C.; FORTUNATO, I.M.; LATTANZIO, V.M.T.; LINSALATAB, V.; CICCIO, N. Relationship of secondary metabolism to growth in oregano (*Origanum vulgare* L.) shoot cultures under nutritional stress. **Environmental and Experimental Botany**, v. 65, p.54-62, 2009.

MACIEL, M.A.; PINTO, A.C. & VEIGA JR., V.F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

- MARIATH, I.R.; FALCAO, H.S.; BARBOSA-FILHO, J.M.; SOUZA, L.C.F.; TOMAZ, A.C.A.; BATISTA, L.M.; DINIZ, M.F.F.M.; ATHAYDE-FILHO, P.F.; TAVARES, J.F.; SILVA, M.S.; CUNHA, E.V.L. Plants of the American continent with antimalarial activity. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.19, 158-192, 2009.
- MARTINS, S.E.; ROSSI, L.; SAMPAIO, P.S.P.; MAGENTA, M.A.G. Caracterização florística de comunidades vegetais de restinga em Bertiooga, SP, Brasil. **Acta Botanica Brasílica**, v. 22, n. 1, p. 249-274, 2008.
- MEDEIROS, J.D. A Biotecnologia e a extinção de espécies. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, ed. 30, p. 109-113, 2003.
- MENDIS, K.; SINA, B.J.; MARCHESINI, P.; CARTER, R. The neglected burden of *Plasmodium vivax* malaria. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene** 64, p. 97-106, 2001.
- MEYER, B.N.; FERRIGNI, N.R.; PUTNAM, J.E.; JACOBSEN, L.B.; NICHOLS, D.E.J.; McLAUGHLIN, J.L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica**, v. 45, p. 31-34, 1982.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE, Manual de Diagnóstico Laboratorial da Malária. 2005. Disponível em: < <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/default.cfm>>. Acesso em: 29 nov. 2010.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008. Disponível em: < <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/default.cfm>>. Acesso em: 29 nov. 2010.
- MONTARROYOS, A.V.V. Contaminação *in vitro*. **ABCTP**, n. 36-37, 2000.
- MONTENEGRO, L.H.M.; OLIVEIRA, P.E.S.; CONSERVA, L.M.; ROCHA, E.M.M.; BRITO, A.C.; ARAUJO, R.M.; TREVISAN, M.T.S.; LEMOS, R.P.L. Terpenóides e avaliação do potencial antimalárico, larvicida, anti-radicalar e anticolinesterásico de *Pouteria venosa* (Sapotaceae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 16, p. 611-617, 2006.
- MORAIS, S.M.L.; CAVALCANTI, E.S.B.; BERTINI, L.M.; OLIVEIRA, C.L.L.; RODRIGUES, J.R.B.; CARDOSO, J.H.L. Larvicidal activity of essential oils from Brazilian *Croton* species against *Aedes aegypti*. **American Mosquito Control Association**. v. 22, p. 161-164, 2006.
- MURPHY, S. C.; BREMAN, J. G. Gaps in the childhood malaria burden in Africa: cerebral malaria, neurological sequelae, anemia, respiratory distress, hypoglycemia, and complications of pregnancy. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**. v. 64 , p. 57-67, 2001.
- NANDAGOPAL, S. & RANJITHA KUMARI, B. D. Effectiveness of auxin induced *in vitro* root culture in chicory. **Journal of Central European Agriculture**, v. 8, n. 1, p. 73-80, 2007.
- OMS, World malaria report. Disponível em: [http://www.who.int/malaria/world\\_malaria\\_report\\_2009/en/index.html](http://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2009/en/index.html) - Acesso em: 05 maio 2011.

- PANDEY, V. P.; CHERIAN, E.; PATANI, G. Effect of growth regulators and culture conditions on direct root induction of *Rauwolfia serpentina* L. (Apocynaceae) benth by leaf explants. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 9, n.1, p. 27-34, 2010.
- PASKA, C.; INNOCENTI, G.; KUNVARI, M.; LASZLO, M.; SZILAGYI, L. Lignan production by *Ipomoea cairica* callus cultures. **Phytochemistry**, v.52, p.879-883, 1999.
- PASQUA, G.; MONACELLI, B.; VALLETTA, A.; SANTAMARIA, A.R.; FIORILLO, F. Synthesis and/or accumulation of bioactive molecules in the *in vivo* and *in vitro* root. **Plant Biosystems**. v. 139, p.180-188, 2005.
- PRICE, R.N.; TIJITRA, E.; GUERRA, C.A.; YEUNG, S.; WHITE, N.J.; ANSTEY, N.M. Vivax malaria: neglected and not benign. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene** **77**, p. 79-87, 2007.
- RBM, RBM Vision. 2010. Disponível em: < <http://www.rollbackmalaria.org/rbmvision.html> >. Acesso em: 21 abr. 2010.
- REZENDE, A.H.; PELUZIO, M.C.G.; SABARENSE, C.M. Experimentação animal: ética e legislação brasileira. **Revista de Nutrição**, v.21, n. 2, p. 237-242, 2008.
- ROCCA, M.A.; SAZIMA, M.; SAZIMA, I. Um pica-pau que aprecia bebidas doces: o João-velho procura néctar e poliniza plantas do dossel no Sudeste do Brasil. **Biota Neotropica**, v. 6, p. 1-9, 2006.
- ROCCA, M.A.; SAZIMA, M. Ornithophilous canopy species in the Atlantic rain forest of southeastern Brazil. **Journal of Field Ornithology**, v. 79, n 8, p. 130-137, 2008.
- ROCHA, M.E.N. **Potencialidades Biodinâmicas de *Norantea brasiliensis* Choisy (Marcgraviaceae)**. Tese (Mestrado em Biologia celular e molecular). Instituto Oswaldo Cruz, 2002.
- SÁ, A.F.; MELLO, G.S.; MANSUR, E.; ALBARELLO, N. Efeito dos reguladores de crescimento BAP e TDZ na produção de brotos *in vitro* de *Norantea brasiliensis* Choisy (Marcgraviaceae). **XI Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos de Plantas**, 2009.
- SÁ, A.F. **Conservação *ex situ* e avaliação do potencial medicinal de *Norantea brasiliensis* Choisy (Marcgraviaceae)**. Tese (Mestrado em Biotecnologia Vegetal). Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2010.
- SECRETARIA MUNICIPAL DE MEIO AMBIENTE. Espécies ameaçadas de extinção no município do estado do Rio de Janeiro: Flora e Fauna, p. 65, 2000.
- SIMAS, N.K.; LIMA, E.C.; CONCEIÇÃO, S.R.; KUSTER, R.M.; FILHO, A.M.O.; LAGE, C.L.S. Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue – atividade larvicida de *myroxylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilpropanóides. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 46-49, 2004.
- SIMÕES, C.; ALBARELLO, N.; CALLADO, C.H.; DE CASTRO, T.C.; MANSUR, E. New approaches for shoot production and establishment of *in vitro* root cultures of *Cleome rosea* Vahl. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 98, p.79-86, 2009.



SINAVESAN, I.; JEONG, B.R. Induction and establishment of adventitious and hairy root cultures of *Plumbago zeylanica* L. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n.20, p. 5294-5300, 2009.

SINITOX. Sistema Nacional de Informações Tóxico Farmacológicas. [http://www.fiocruz.br/sinitox\\_novo/media/tab02\\_brasil\\_2008.pdf](http://www.fiocruz.br/sinitox_novo/media/tab02_brasil_2008.pdf) - Acesso em: 27 dez. 2011.

SIVAKUMAR, G. Bioreactor technology: A novel industrial tool for high-tech production of bioactive molecules and biopharmaceuticals from plant roots. **Journal of Biotechnology**, v. 1, p. 1419-1427, 2006.

SIQUEIRA, J.M.; BOMM, M.D.; PEREIRA, N.F.G. Estudo fitoquímico de *Unonopsis lindmanii* - Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre a *Artemia salina* leach. **Química Nova**, v. 21, n 5, p. 557-559, 1998.

SMILKSTEIN, M.; SRIWILAJAROEN, N.; KELLY, J.X.; WILAIRAT, P.; RISCOE, M. Simple and inexpensive fluorescence-based technique for high-throughput antimalarial drug screening **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, p. 1803-1806, 2004.

SNOW, R.W.; KORENROMP, E.L.; GOUWS, E. Pediatric mortality in Africa: *Plasmodium falciparum* malaria as a cause or risk? **American Journal Tropical Medicine Hygiene** **71**, p.16-24, 2004.

SOUSA, F.C.F.; MELO, C.T.V.; CITÓ, M.C.O.; CAVALCANTE, F.H.; VASCONCELOS, S.M.M.; FONTELES, M.M.F.; FILHO, J.M.B.; VIANA, G.S.B. Plantas medicinais e seus constituintes bioativos: Uma revisão da bioatividade e potenciais benefícios nos distúrbios da ansiedade em modelos animais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 642-654, 2008.

SOUZA, A.V.; PEREIRA, A.M.S. Enraizamento de plantas cultivadas *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.9, n.4, p.103-117, 2007.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4rd ed. Artmed, 2010, p. 722.

TRAGER, W.; JENSEN, J. **Science**, v. 193, p. 673-675, 1976.

VALLA, A.; VALLA, B.; CARTIRER, D.; LE GUILLOU, R.; LABIA, R.; FLORENT, L.; CHARNEAU, S.; SCHREVEL, J.; POTIER, P. New syntheses and potential antimalarial activities of new 'retinoid-like chalcones'. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 41, p. 142-146, 2006.

VELLOSO, M.A.L.; ABREU, I.N.; MAZZAFERA, P. **Indução de metabólitos secundários em plântulas de *Hypericum brasiliense* Choisy crescendo *in vitro***, v. 39, n. 2, p. 267-27, 2009.

VERPOORTE, R.; COLLIN, A.; MEMELINK, J. Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. **Biochemistry**, v. 1, p. 13-25, 2002.

VERONESI, R. *Doenças Infecciosas e Parasitárias*. 8ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991.

- VIVANCO, J. M.; FLORES, H. C. Control of root formation by plant growth regulators. *In*: BARSÁ, A. J. (Ed) Plant growth regulators in agriculture and horticulture: their role and commercial uses. **Food Products Press**. cap.1. p.1-16, 2000.
- WONGSRICHANALAI, C.; PICKARD, A.L.; WERNSDORFER, W.H.; MESHNICK, S.R. Epidemiology of drug-resistant malaria. **Lancet Infectious Diseases**, v. 2, n. 4, p. 209-218, 2002.
- YANIV, Z. & BACHRACH, U. Roots as a Source of Metabolites with Medicinal Activity. *In*: WAISEL, Y.; ESHEL, A.; KAFKAFI, U. (Eds) **Plant Roots: The Hidden Half**, 3ed. Marcel Dekker, New York, p. 1071-1091, 2002.
- ZAMITH, L.R.; SCARANO, F.R. Produção de mudas de espécies das Restingas do município do Rio de Janeiro, RJ, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v.18, p.161-176, 2004.
- ZANINI, A.C.; OGA, S. **Farmacologia aplicada**. São Paulo. Ed. Atheneu, 1979.
- ZHAO, J.; HU, Q.; GUO, Y.Q.; ZHU, W.H. Effects of stress factors, bioregulators, and synthetic precursors on indole alkaloid production in compact callus clusters cultures of *Catharanthus roseus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.55, p.693-698, 2001.
- ZUQUE, A.L.F.; WATANABE, E.S.; FERREIRA, A.M.T.; ARRUDA, A.L.A.; RESENDE, U.M.; BUENO, N.R.; CASTILHO, R.O. Avaliação das atividades antioxidante, antimicrobiana e citotóxica de *Couepia grandiflora* Benth. (Chrysobalanaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, n.2, p. 129-136, 2004.