



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO TECNOLÓGICA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS**

NAZARÉ CARNEIRO DA SILVA

**ATIVIDADE ANTIPLASMÓDICA *IN VITRO* E
ANTIMALÁRICA *IN VIVO* DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Cyperus
articulatus* L.**

Santarém
2019

NAZARÉ CARNEIRO DA SILVA

**ATIVIDADE ANTIPLASMÓDICA *IN VITRO* E
ANTIMALÁRICA *IN VIVO* DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Cyperus
articulatus* L.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências da Universidade Federal do Oeste do Pará, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biociências.

Orientador: Prof. Dr. Waldiney Pires Moraes.

Santarém
2019

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIB/ UFOPA

- S588a Silva, Nazaré Carneiro da.
Atividade Antiplasmódica in vitro e Antimalárica in vivo do óleo essencial de *Cyperus Articulatus* L./ Nazaré Carneiro da Silva – Santarém, 2019.
68 p.: il.
Inclui bibliografias.
- Orientador: Waldiney Pires Moraes.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Oeste do Pará, Programa de Pós Graduação em Biociências.
1. Malária. 2. *Cyperus Articulatus*. 3. Atividade Antiplasmódica. 4. Atividade Antimalárica I. Moraes, Waldiney Pires, orient. II. Título.

CDD: 23 ed. 614.59

Deus, por ter sido tão bom.

Aos meus pais, Edil Lobato da Silva e Leonice Carneiro da Silva, pelos ensinamentos e
incentivos constantes.

Ao meu esposo, Ivanilson Sena de Sousa, pelo amor e compreensão durante meus momentos
de ausência.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que guiou meus passos.

À minha família, irmãos e parentes, pelo amor, apoio e toda ajuda nesse período.

Ao meu orientador Dr. Waldiney Pires Moraes, a quem admiro por sua competência.

À minha coorientadora Dra. Kelly Christina Ferreira Castro, pelas inúmeras discussões e sugestões que enriquecerem esse trabalho.

À Profa. Dra. Tânia Mara Pires Moraes, por todo o tempo disponibilizado para me orientar e por todos os conhecimentos transmitidos.

Ao prof. Dr. Fernando de Pilla Varotti e a Dra. Amanda Luisa Da Fonseca a todos do Laboratório de Bioquímica Medicinal, Universidade Federal de São João del-Rei –UFSJ, Brasil.

Ao prof. Dr. Lauro E. S. Barata e a MSc. Aline Aparecida Kasper e a todos do Laboratório de Pesquisa & Desenvolvimento de Produtos Naturais Bioativos, da Universidade Federal do Oeste do Pará.

Aos meus amigos Suellen Ferreira Gonçalves, Junior Avelino de Araújo, Juliana Erica Cirino Nascimento e Jesse Marcos Maciel Jatý, pelas incontáveis vezes em que me aconselharam.

Aos técnicos José de Sousa Almeida Junior e Jander Marcus Cirino Lopes pelo apoio.

À minha amiga Vânia Sousa de Azevedo, por ter compreendido a minha ausência no nosso empreendimento e ter me dado o suporte necessário.

A todos do Laboratório de Farmacologia, da Universidade Federal do Oeste do Pará.

A todos do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas-CPQBA da Universidade Estadual de Campinas, em especial ao Adilson Sartoratto.

Aos colegas e professores do Programa de Pós-Graduação em Biociências, da Universidade Federal do Oeste do Pará, pelo convívio e agregação de conhecimento.

A todos os colegas do Centro de Testagem e Aconselhamento, especialmente a Janecelly Cristina Rego.

E a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desta pesquisa: muito obrigada!

“Aqueles que se sentem satisfeitos sentam-se e nada fazem. Os insatisfeitos são os únicos benfeitores do mundo.” Walter S. Landor

“Ó profundidade das riquezas, tanto da sabedoria, como da ciência de Deus! Quão insondáveis são os seus juízos, e quão inescrutáveis os seus caminhos!”

Romanos 11:33

RESUMO

A malária é um problema de saúde mundial, sendo endêmica em mais de 90 países, responsável por cerca de 212 milhões de casos no mundo. O Brasil reportou 174.522 casos de malária em 2017, um aumento de 48,11% em relação a 2016. Apesar do grande interesse em erradicar a malária, atualmente não temos uma vacina efetiva sendo a profilaxia e o tratamento medicamentoso as formas utilizadas para o controle da doença. A resistência ao tratamento desenvolvida pelo plasmódio ameaça o controle, evidenciando a necessidade de desenvolvimento de novos compostos contra esta doença. Nesse contexto, o presente trabalho estudou o óleo essencial obtido de rizomas de *Cyperus articulatus* (OECA) para investigar sua composição química, toxicidade aguda e atividades antiplasmódica e antimalárica *in vitro* e *in vivo*, respectivamente e fundamentar seu possível uso como alternativa terapêutica no tratamento de malária. Realizou-se a análise da composição química do OECA coletados na região do Tabocal no município de Santarém, Pará, Brasil, utilizando um cromatógrafo a gás Agilent HP-6890, a avaliação da toxicidade *in vivo* em camundongos BALB/c conforme o Guia OECD, a citotoxicidade pelo método de MTT com a linhagem celular WI-26VA-4, posteriormente a atividade antiplasmódica *in vitro*, utilizando cepas de *Plasmodium falciparum* W2 (cloroquina-resistente) e 3D7 (cloroquina-sensível) cultivadas em hemácias em microplaca de 96 poços e antimalárica *in vivo* utilizando camundongos da linhagem BALB/c infectados com aproximadamente 10^6 eritrócitos parasitados pelo *P. berghei* recebendo tratamento no 4º dia após a inoculação, foram tratados durante 7 dias consecutivos e submetidos a coleta sanguínea para determinação dos parâmetros hematológicos. A caracterização química por GC-MS possibilitou a identificação de 37 compostos apresentando a mustacona como composto majoritário. A dose tóxica aguda do OECA é maior que 2000 mg/kg em camundongos BALB/c, classificando-a na categoria 5 do Globally Harmonized Classification System (GHS). *In vitro*, o OECA apresenta baixa citotoxicidade e alto potencial antiplasmódico ($IC_{50} < 10 \mu\text{g ml}^{-1}$) frente às duas cepas de *P. falciparum* testadas. *In vivo*, reduziu significativamente ($p < 0,001$) a parasitemia induzida pelo *P. Bergheie*, consequentemente, obteve melhora dos parâmetros hematológicos nas doses de 100 e 200 mg/kg/dia. Diante do exposto, o OECA representa um produto extraído da Amazônia com potencial antiplasmódico e antimalárico validando o uso popular e viabilizando o OECA como seguro e promissor candidato a medicamento ou fonte de substâncias, sendo necessários estudos complementares.

Palavra-chave: Malária, *Cyperus articulatus*, *Plasmodium*, Atividade Antimalárica e Atividade Antiplasmódica.

ABSTRACT

Malaria is a worldwide health problem and is endemic in over 90 countries, with about 212 million cases worldwide. Brazil reported 174,522 cases of malaria in 2017, an increase of 48.11% over 2016. Despite the keen interest in eradicating malaria, the current is not since efficacy is prophylaxis and drug treatment as used forms. for disease control. Delaying the efficacy of control plasma diagnosis, highlighting the need for development of new compounds against this disease. In the context, the present work studied the essential oil obtained from *Cyperus articulatus* rhizomes (OECA) to investigate its chemical appearance, acute toxicity and antiplasmodic and antimalarial activities in vitro and in vivo, with and without their own use as therapeutic alternative. malaria. The analysis of the chemical composition of the OECA collected in the Tabocal region in the municipality of Santarém, Pará, Brazil, using an Agilent HP-6890 gas chromatograph, in vivo toxicity evaluation in BALB / c mice according to the OECD Guide, was performed. MTT cytotoxicity with WI-26VA-4 cell line, followed by in vitro antiplasmodic activity using *Plasmodium falciparum* W2 (chloroquine-resistant) and 3D7 (chloroquine-sensitive) strains cultured in red blood cells in 96-well microplate and In vivo antimalarial infection using BALB / c mice infected with approximately 106 *P. berghei*-parasitized erythrocytes receiving treatment on the 4th day after inoculation were treated for 7 consecutive days and subjected to blood collection to determine hematological parameters. Chemical characterization by GC-MS allowed the identification of 37 compounds with mustacone as the major compound. The acute toxic dose of OECA is greater than 2000 mg / kg in BALB / c mice, classifying it in category 5 of the Globally Harmonized Classification System (GHS). In vitro, OECA presents low cytotoxicity and high antiplasmodic potential (IC₅₀ <10 µg ml⁻¹) against the two *P. falciparum* strains tested. In vivo, it significantly reduced (p <0.001) *P. Berguei*-induced parasitemia and consequently improved hematological parameters at doses of 100 and 200 mg / kg / day. Given the above, OECA represents a product extracted from the Amazon with antiplasmodic and antimalarial potential validating popular use and making OECA a safe and promising candidate for a drug or source of substances, and further studies are needed.

Keywords: Malaria, *Cyperus articulatus*, *Plasmodium*, Antimalarial Activity and Antiplasmodic Activity.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 A MALÁRIA NO MUNDO E NO BRASIL	15
1.2 CARACTERÍSTICAS DA MALÁRIA	17
1.2.1 Vacina.....	17
1.3 CICLO BIOLÓGICO DO <i>PLASMODIUM</i>	18
1.4 PATOGENIA DA MALÁRIA.....	19
1.5 DIAGNÓSTICO	22
1.5.1 Diagnóstico Clínico da Malária.....	22
1.5.2 Diagnóstico Laboratorial da Malária.....	22
1.6 DROGAS ANTIMALÁRICAS.....	24
1.6.1 Derivados da artemisinina	26
1.6.2 Quinolinas.....	27
1.6.3 Antifolatos	27
1.7 PLANTAS MEDICINAIS.....	28
1.7.1 <i>Cyperus articulatus</i>	30
1.7.2 Propriedades medicinais de <i>C. articulatus</i>	31
2 JUSTIFICATIVA	33
3 OBJETIVOS	34
3.1 OBJETIVO GERAL.....	34
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
4 MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL	35
4.2 EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>C. articulatus</i>	35
4.3 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DO OECA.....	35
4.4 CULTIVO DE CÉLULAS WI 26VA-4.....	35
4.5 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE	36

4.6 CULTIVO <i>IN VITRO</i> DAS FASES INTRARITROCITÁRIAS DE <i>PLASMODIUM FALCIPARUM</i>	36
4.7 SINCRONIZAÇÃO DO CULTIVO DE <i>PLASMODIUM FALCIPARUM</i>	37
4.8 TESTES ESQUIZONTICIDAS <i>IN VITRO</i> COM <i>PLASMODIUM FALCIPARUM</i>	37
4.9 ANIMAIS	38
4.10 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA.....	38
4.11 INDUÇÃO DO MODELO EXPERIMENTAL	39
4.12 DESENHO EXPERIMENTAL DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE PARASITARIA.....	39
4.13 DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE PARASITARIA	39
4.14 ANÁLISE DE SOBREVIVÊNCIA DOS ANIMAIS	40
4.15 PROCEDIMENTOS DE COLETA SANGUÍNEA	40
4.16 PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS	40
5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	41
6 RESULTADOS	42
6.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO OECA.....	42
6.2 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE ORAL AGUDA.....	45
6.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMALÁRICA <i>IN VITRO</i>	45
6.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMALÁRICA <i>IN VIVO</i>	46
6.4.1 Análise Quantitativa da Evolução da Parasitemia.....	46
6.4.2 Avaliação dos Parâmetros Hematológicos	47
6.4.3 Avaliação do Tempo de Sobrevida dos Animais.....	49
7 DISCUSSÃO	52
8 CONCLUSÃO.....	60
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Países endêmicos da malária entre 2000 e 2016.....	15
Figura 2- Prevalência de espécies de <i>plasmodium</i> nas regiões endêmicas a malária em 2014.	16
Figura 3- Ciclo de vida do <i>plasmodium</i>	18
Figura 4- Plantação de pripioca (<i>cyperus articulatus</i>) na fazenda experimental da ufopa. ...	29
figura 5- Rizoma e tubérculo de <i>cyperus articulatus</i>	30
Figura 6- Constituintes majoritários identificados e respectivas concentrações encontradas no óleo essencial de <i>cyperus articulatus</i>	44
Figura 7 - Evolução da parasitemia dos camundongos BALB/c infectados com <i>plasmodium</i> <i>berghei</i>	47
Figura 8 - Tempo de sobrevivência dos camundongos BALB/c infectados com <i>plasmodium</i> <i>berghei</i>	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Relação de autores que pesquisaram sobre <i>c. articulatus</i> e as propriedades medicinais identificadas por eles.....	31
Tabela 2- Identificação da composição química do oeca por gc-ms.....	42
Tabela 3- Evolução da toxicidade oral aguda do oeca : média do peso corporal (gramas \pm desvio padrão) de camundongos BALB/c após administração das doses de 5, 50, 300 e 2000 mg/kg.	45
Tabela 4- Atividade antiplasmódica <i>in vitro</i> , citotoxicidade e índice de seletividade (is) do oeca.	45
Tabela 5- Análise hematológica de grupos experimentais tratados com oeca e artemisinina no 11º dia após a infecção por <i>p. berghei</i> de camundongos BALB/c.....	48
Tabela 6- Análise hematológica (leucograma) de grupos experimentais tratados com oeca e artemisinina no 11º dia após a infecção por <i>p. berghei</i> de camundongos BALB/c.	49

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

3D7	Cepa Cloroquina-Sensível
ACT	Artemisinin Combined Therapy
ALT	Aspartato Aminotransferase
AST	Alanina Aminotransferase
DHFR	Dihidrofolato Redutase
DHPS	Dihidropteroato Sintase
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
FCM	Citometria De Fluxo
GHS	Globally Harmonized Classification System
HCT	Determinação do hematócrito
HGB	Quantificação de hemoglobina
IC50	Concentração que Inibe 50%
IK	Índice de Kovat
IS	Índice de Seletividade
LAMP	Amplificação Isotérmica Mediada Por Loop
LDH	Lactato Desidrogenase
MPEG	Museu Paraense Emilio Goeldi
MS	Espectrometria De Massa

MTT	Brometo 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-Difeniltetrazol
OECA	Óleo essencial de <i>Cyperus articulatus</i>
OMS/WHO	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
PABA	Ácido Para-Amino Benzoico
PbA	Cepa Plasmodium berghei
PCR	Reação em Cadeia De Polimerase
QBC	Quantitativo De Buffy Coat
RBC	Contagem total de eritrócitos
RDT	Teste De Diagnostico Rápido
SNC	Sistema Nervoso Central
W2	Cepa Cloroquina-Resistente
WBC	Números absolutos de leucócitos
WI 26VA-4	Linhagem Celular Fibroblasto de Pulmão Humano
γ-GT	Gama-Glutamiltransferase

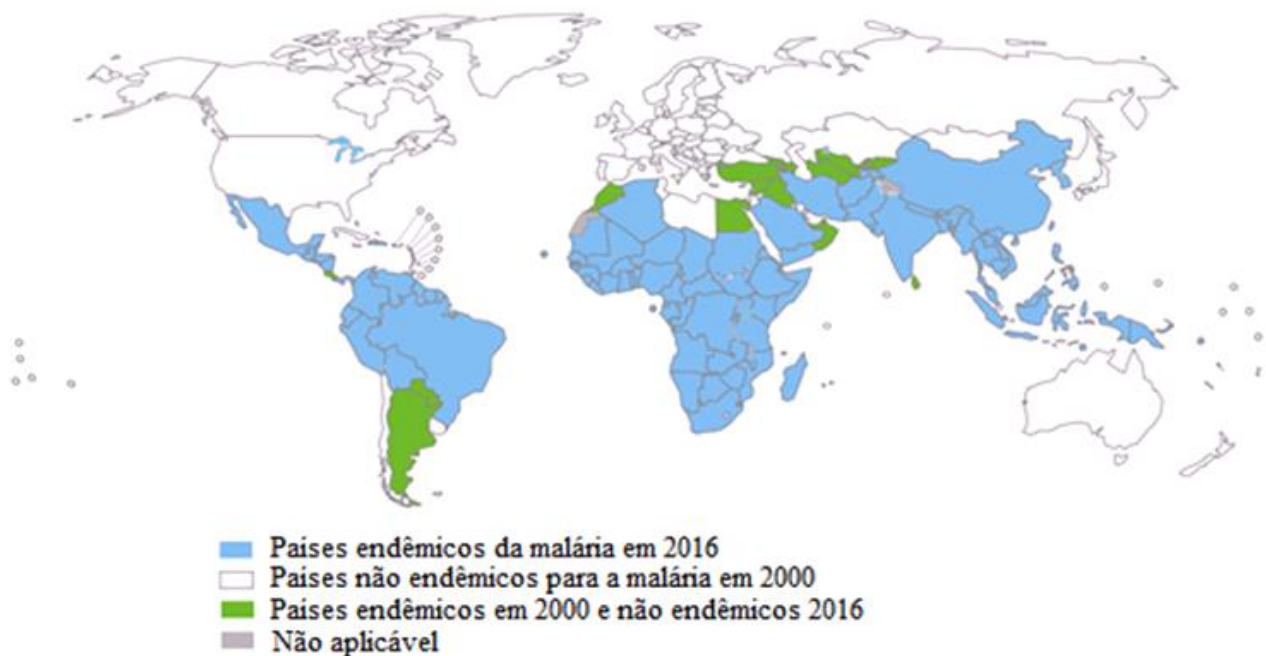
1 INTRODUÇÃO

1.1 A MALÁRIA NO MUNDO E NO BRASIL

Apesar da redução da incidência dos casos de malária em cerca de 41% e da mortalidade em 62% entre os anos de 2000 e 2016, a malária ainda é um problema de saúde mundial. É considerada endêmica em mais de 90 países como mostrado na (figura 1), afetando mais de 216 milhões de pessoas no mundo e levando a aproximadamente 445 mil mortes por ano (WHO,2017).

Figura1-Países endêmicos da malária entre 2000 e 2016.

Fonte:Adaptado de (WHO, 2016).

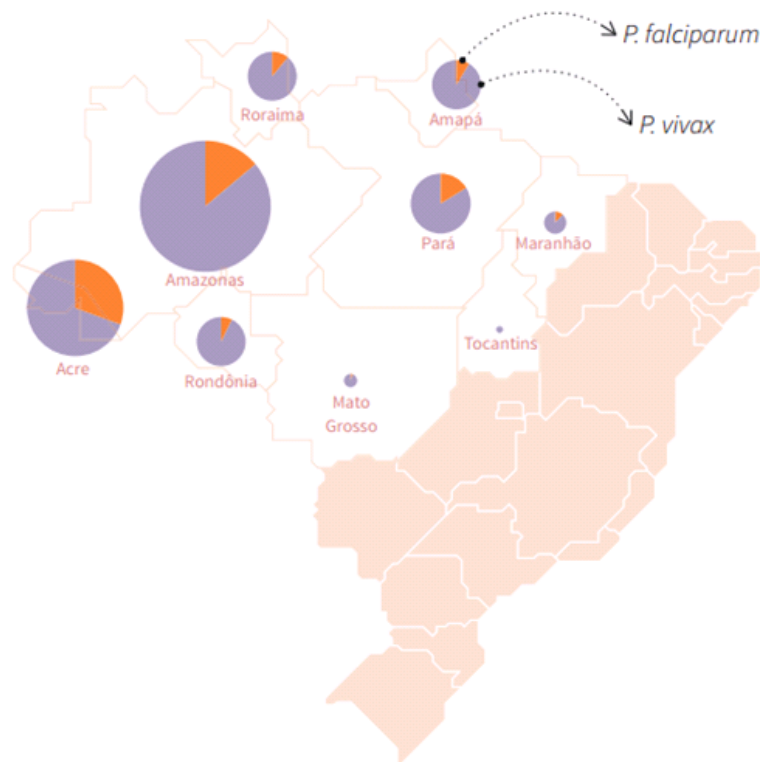


A malária possui distribuição global relacionada a fatores sazonais preponderante em regiões tropicais e subtropicais do mundo como na África, no Sudeste Asiático e na Região Amazônica da América do Sul, onde são relativamente mais comuns infecções por parasitas, bactérias e vírus, hemoglobinopatias, talassemia e enzimopatias de eritrócitos e desnutrição(OLIVEIRA *et al.*, 2014). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), quase metade da população mundial, cerca de 3,2 bilhões de pessoas em 97 países, corre o risco de serem infectadas pela *Plasmodium* (WHO, 2016).

Segundo a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), os casos de malária aumentaram na América em 2016 e 2017, estando entre as quatro principais doenças endêmicas. Entre os países que notificaram o aumento estão Brasil, Colômbia, Equador, El Salvador, Haiti, Honduras, Nicarágua, México, Panamá e Venezuela(OLIVEIRA *et al.*, 2014).

No Brasil principalmente duas espécies são associadas a casos autóctones em seres humanos: *Plasmodium vivax* e *P. falciparum* (figura 2). Os casos por *P. vivax* são predominantes no país seguidos por *P. falciparum*(BRASIL, 2015b). As regiões rurais e indígenas são responsáveis por 86% dos casos(BRASIL, 2015a).

Figura2-Prevalência de espécies de *Plasmodium* nas regiões endêmicas a malária em 2014.



Fonte: (BRASIL, 2015b).

O Brasil reportou 174.522 casos de malária em 2017, representando um aumento de 48,11% quando comparado com os casos notificados em 2016, sendo que mais de 99% ocorreram na Amazônia Legal a qual compreende os estados do Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins. A ocorrência de maior número de casos nessa região decorre de suas condições climáticas favoráveis para a existência do vetor, da falta de saneamento adequado e dos assentamentos desordenados (OLIVEIRA *et al.*, 2014).

Somente no Estado do Pará, foram notificados 33.122 mil novos casos de malária em 2017, o que representa aumento de 150% dos casos em relação aos 13.235 mil casos notificados em 2016, sendo o segundo Estado com maior número de infecções (OPAS, 2018). Os municípios da região oeste do estado do Pará que mais contribuíram para esse aumento foram Itaituba, Almeirim, Óbidos, Jacareacanga, Alenquer e Santarém (BRASIL, 2018).

1.2 CARACTERÍSTICAS DA MALÁRIA

A malária é uma doença infecciosa e parasitária, provocada por protozoários intracelulares do subfilo Apicomplexa do gênero *Plasmodium*, que possui aproximadamente 150 espécies, em que somente cinco são descritas como responsáveis por infectar seres humanos: *P. falciparum*; *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* e *P. knowlesi*. A transmissão ao homem ocorre através da picada das fêmeas dos mosquitos do gênero *Anopheles* infectadas (NEVES *et al.*, 2011; SINGH; DANESHVAR, 2013).

A infecção ocasionada pelo *P. falciparum* é considerada a mais letal; A espécie *P. vivax* é amplamente distribuída pelos trópicos; A espécie *P. malariae* possui distribuição esporádica; *OP. ovale* encontra-se restrito na região Centro-Oeste da África em algumas ilhas do Pacífico Sul; A espécie *P. Knowlesi* é infectante de macacos concentrada no sudeste Asiático e descrita recentemente como infectantes de malárias em humanos (SINGH ; DANESHVAR, 2013; LEITE *et al.*, 2014).

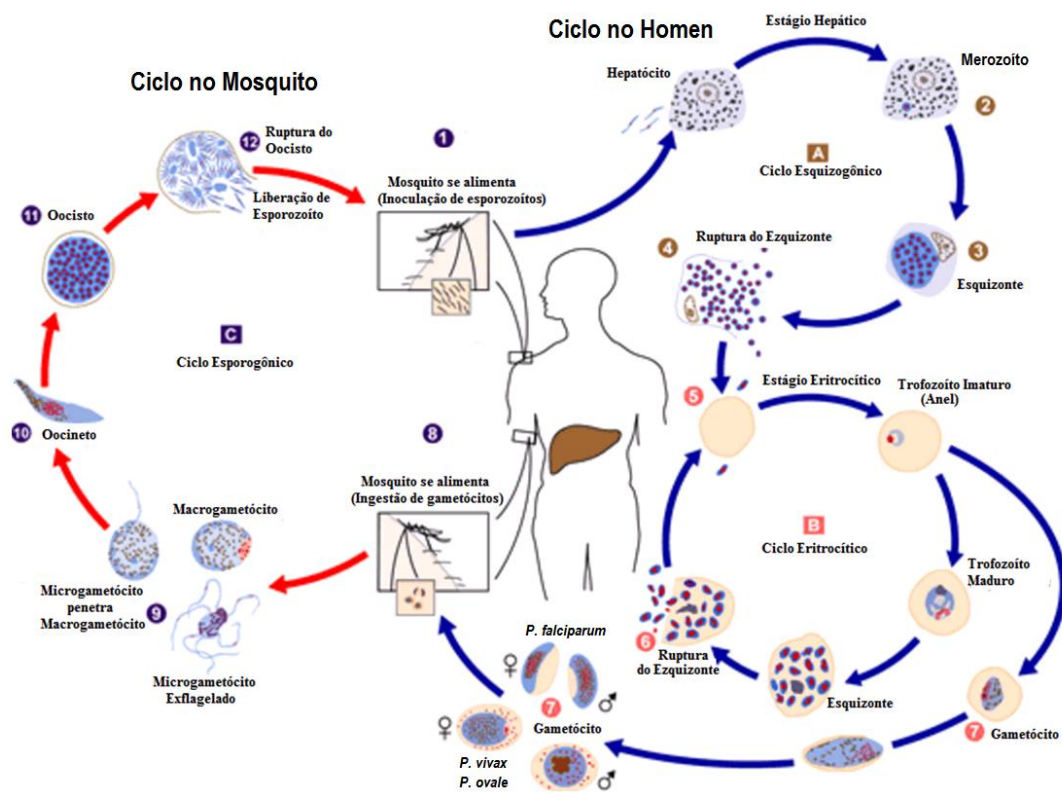
1.2.1 Vacina

É grande o interesse em erradicar a malária, no entanto, atualmente, não existe uma vacina eficaz. Embora o desenvolvimento de vacinas seja o principal eixo da pesquisa para erradicar a malária, o progresso tem sido inadequado. As vacinas para a malária são geralmente classificadas de acordo com o alvo de ação no ciclo de vida do *Plasmodium*, divididas em: Vacinas pré-eritrocitária, que visam bloquear a infecção no sangue; Vacinas eritrocitárias de estágios sanguíneos, que têm como objetivo eliminar a parasitemia e prevenir o quadro clínico; e as vacinas que bloqueiam a transmissão. Em 2012, Vaccine Technology Roadmap estabeleceu a meta de desenvolver uma vacina 75% eficaz até 2030 (CROMPTON *et al.*, 2014; HEMINGWAY *et al.*, 2016).

1.3 CICLO BIOLÓGICO DO *PLASMODIUM*

Há quatro estágios no qual o *Plasmodium* necessita passar a fim de completar o seu ciclo biológico. São eles: estágio de desenvolvimento hepático e reprodução assexuada, que ocorre no hospedeiro vertebrado; a formação dos gametas e dos esporozoítos, que ocorre na fêmea do mosquito (figura3)(GERALD *et al.*, 2011; NEVES *et al.*, 2011).

Figura3- Ciclo de vida do *Plasmodium*



Fonte: Adaptado de CDC, (2016).

Portanto, o ciclo biológico das espécies de *Plasmodium* inicia-se com a inoculação de esporozoítos haploides (n) na corrente sanguínea do hospedeiro pela fêmea do mosquito ao alimentar-se. Estes migram pela circulação até alcançarem o fígado, onde invadem os hepatócitos e, por reprodução assexuada, que desenvolvem-se em esquizontes e diferenciam-se em merozoítos(SINGH; DANESHVAR, 2013).

Ao maturar-se, o esquizonte hepático se rompe, liberando milhares de merozoítos na corrente sanguínea, onde invadem os eritrócitos a fim de continuar seu desenvolvimento, dando início ao ciclo eritrocítico. No interior dos eritrócitos, os merozoítos diferenciam-se em trofozoítos, formando um anel que, posteriormente, desenvolve-se em esquizonte. A segmentação do esquizonte contém inúmeros novos merozoítos que, ao romperem a membrana

celular, caem na circulação infectando novos glóbulos vermelhos, reiniciando dessa forma, o ciclo(SINGH; DANESHVAR, 2013).

Após algumas gerações, aproximadamente de 10-12 dias, os merozoítos se diferenciam em gametócitos haploides masculinos e femininos, sendo essenciais para a reprodução sexuada. Estes, após serem ingeridos pelo mosquito, passam pelo processo de fertilização, dando origem a uma célula diploide (2n) chamada zigoto. Posteriormente o zigoto diferencia-se em uma forma móvel tetraploide (4n), denominada oocineto, que migra para o intestino do mosquito e ao se fixar no epitélio intestinal, desenvolve-se em oocisto. A ruptura do oocisto libera esporozoítos maduros que migram para a glândula salivar do mosquito, facilitando dessa maneira, a transmissão do parasito para o hospedeiro humano ao alimentar-se (GERALD *et al.*, 2011; JOSLING; LLINÁS, 2015).

1.4 PATOGENIA DA MALÁRIA

As alterações fisiopatológicas iniciais da malária são comuns para todas as espécies e compreendem alterações complexas nos eritrócitos, na circulação e nas reações imunológicas provocadas pelo desenvolvimento intraeritrocitário do parasito. Dentre os principais sintomas apresentados estão: tremores, frio e uma alta súbita da temperatura corporal, o que desencadeia náuseas, cefaléia, dores musculares e abdominais, falta de apetite e distúrbios gastrointestinais e, posteriormente, anemia. Os sinais e sintomas clínicos estão associados ao ciclo eritrocítico da malária de acordo com o tipo de *Plasmodium* infectante que corresponde ao momento da ruptura das hemácias e liberação dos merozoítos, os sintomas se repetem em ciclos de 24h (*P. knowlesi*), 48h (*P. vivax e ovale*), 36h (*P. falciparum*) e 72h (*P. malariae*)(BUFFET *et al.*, 2011; NEVES *et al.*, 2011; CROMPTON *et al.*, 2014).

O quadro clínico da malária é dividido em leve, moderado ou grave dependendo da espécie do parasito, a parasitemia do paciente e a imunidade adquirida. Os sintomas clínicos iniciais inespecíficos são semelhantes às outras patologias como dengue, febre amarela e leptospirose, devido a isso o diagnóstico depende principalmente da confirmação laboratorial por microscopia da gota espessa ou testes imunocromatográfico (BRASIL, 2010).

A infecção causada pelas espécies *P. falciparum* tem início febril e é responsável pelo desenvolvimento da forma grave da patologia, com acometimento do sistema nervoso central (SNC) como anemia grave, insuficiência renal, disfunção pulmonar, choque, coagulação intravascular disseminada, hipoglicemia, acidose metabólica e disfunção hepática (WICKRAMASINGHE; ABDALLA, 2000; GOMES *et al.*, 2011).

Durante a fase intraeritrócitaria, o desenvolvimento do parasito causa alterações moleculares levando a remodelação do eritrócito infectado e não infectado, modificando as propriedades de aderência e deformidade e, conseqüentemente, o sequestro das células pelo baço, contribuindo para o desenvolvimento da anemia e manifestações clínicas. As principais alterações hematológicas associadas à malária são: Eosinopenia; Linfopenia provocada pela redistribuição dos linfócitos; Trombocitopenia leve ou moderada relacionada à coagulação intravascular, durante os primeiros dois dias há uma neutrofilia seguido de neutropenia com desvio a esquerda; Plaquetopenia leve ou moderada sem manifestação hemorrágica; e monocitose. Nota-se a formação de rouleaux provocado pela hipergamaglobulinemia policlonal e a presença de monócitos e neutrófilos contendo pigmento malárico. (WICKRAMASINGHE; ABDALLA, 2000; BUFFET *et al.*, 2011).

A malária apresenta manifestações agudas e crônicas. Os principais achados clínicos na malária aguda são febre, náuseas, anemia leve, posteriormente, esplenomegalia com baço palpável. A malária crônica é resultado de repetidas contaminações, a maioria dos pacientes não apresenta febre, eles possuem baixa parasitemia e são anêmicos, estando presente principalmente em região endêmicas (WICKRAMASINGHE; ABDALLA, 2000; WHITE, 2014).

As alterações patológicas da infecção pelo parasito do gênero *Plasmódio* normalmente provocam distúrbios hematológicos como a anemia. Apesar de estar presente tanto na forma aguda ou grave da malária possui fisiopatologias diferentes. A anemia encontrada na malária aguda tem como principais causas a suspensão da eritropoiese e a acentuada hemólise periférica. A malária crônica é causada pela eritropoiese ineficaz, desencadeada pela perduração dos altos níveis de eritropoetina desenvolvendo a hiperplasia eritroide acentuada (WICKRAMASINGHE; ABDALLA, 2000; SINGH; DANESHVAR, 2013).

A disfunção hepática, principalmente na malária grave, pode ocasionar severas complicações por meio de manifestações como: icterícia, hepatomegalia e aumento de determinadas enzimas como as aminotransferases. Desse modo, induz algumas alterações na função do órgão como a gliconeogênese, redução da produção de fatores de coagulação e dificuldade de metabolização hepática. Além disso, apresenta algumas manifestações semelhantes a outras patologias como hepatite e febre amarela, ocasionando possíveis confusões diagnósticas (GOMES *et al.*, 2011).

O mecanismo de falência renal ainda não está totalmente elucidado, porém há hipóteses que indicam alterações na microcirculação causada pela citoaderência das hemácias. Desse modo, o aumento de expressões de fatores de adesão celular induzíveis na parede do vaso

e a produção de “rosetas” interferem no fluxo sanguíneo na medida em que as células infectadas sofrem remodelamentos e aderem a células normais formando agregados celulares. Por conseguinte, ocorre à obstrução mecânica e a perda de fluidos por múltiplos mecanismos que provavelmente contribuem para o desencadeamento da falência renal (DAS, 2008; GOMES *et al.*, 2011).

A eriptose descrita em várias condições clínicas como na anemia falciforme, anemia ferropriva, sepse, doença de Wilson, deleção do fosfato, β -talassemia e malária. Na malária a eriptose é causada pelo estresse oxidativo das hemácias infectadas pelo *Plasmodium*, a exposição da fosfatidilserina na superfície celular gera desordem na membrana, desencadeando a entrada de Ca^{2+} pelos canais catiônicos permeáveis, que por sua vez provoca a perda celular de KCl por estimular os canais de K^+ , levando a redução de volume celular. A apresentação da fosfatidilserina na membrana também provoca o reconhecimento e a fagocitose das hemácias por macrófagos, levando a eliminação das células infectadas circulantes. Esses dois mecanismos provocam a depuração acelerada dos eritrócitos causando anemia que leva a ativação dos linfócitos T CD8+ citotóxicos que expressão dos marcadores HLA-DR e o CD69, por conseguinte ativam as células T helper e citolíticas. (GOMES *et al.*, 2011; CROMPTON *et al.*, 2014).

A resposta imune da malária é complexa, respondendo por mecanismos celulares (células fagocíticas) e humorais (anticorpos). (Ballal *et al.*, 2011; Crompton *et al.*, 2014; Muniz *et al.*, 2017). A imunidade sólida ao *Plasmodium* se desenvolve somente após anos em áreas endêmicas através de inúmeras exposições acumulativas, o que leva a quadros clínicos de febre sem complicações culminando em uma produção gradual de anticorpos específicos e na resistência à doença. A resistência à infecção hepática é raramente alcançada provocando infecções assintomáticas principalmente em adultos que vivem em áreas endêmicas (GOMES *et al.*, 2011; CROMPTON *et al.*, 2014).

As estratégias de controle da infecção estão baseadas no desenvolvimento de vacinas e medicamentos, assim como no avanço de políticas de erradicação do vetor, quimioprofilaxia e melhoria dos sistemas de saúde (Frason *et al.*, 2009). Dentre as principais drogas utilizadas para o tratamento da malária destaca-se a família das quinolinas formadas pelas 4- aminoquinolinas, as 8-aminoquinolinas e os álcoois quinolínicos que incluem drogas como a cloroquina, primaquina, quinina, mefloquina, lumefantrina (BRASIL, 2010) e a Artemisinina, sendo o principal agente antimalárico utilizado em tratamento de casos graves, porém a resistência desenvolvida pelo plasmódio inviabiliza sua utilização em muitos casos, além da elevada

toxicidade ao organismo, que agrava o quadro de disfunção hepática e renal produzido pela patologia (ARIEY *et al.*, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2014).

1.5 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico rápido, eficaz e preciso da malária é um desafio, não somente em regiões que possuem recursos limitados, mas também em países desenvolvidos e em áreas não endêmicas onde os especialistas são raros e não consideram a malária como hipótese de diagnóstico. A rápida detecção do parasito, além de aliviar o sofrimento, diminui o risco de infecção para sociedade e direciona a escolha adequada para o tratamento. (TANGPUKDEE *et al.*, 2009; HEMINGWAY *et al.*, 2016).

As características variáveis, incluindo as 5 espécies de malária que se apresentam em diferentes estágios no ciclo eritrocítico, a quantificação da parasitemia, os variados graus de imunidade por malária recorrente, as movimentações da população em áreas consideradas endêmicas, os sinais e sintomas considerados comuns dificultam o diagnóstico. Esses fatores são as principais causas de morte por essa patologia. O diagnóstico da malária é dividido em clínico e laboratorial.(TANGPUKDEE *et al.*, 2009; HEMINGWAY *et al.*, 2016).

1.5.1 Diagnóstico Clínico da Malária

O diagnóstico clínico da malária é amplamente praticado pelos médicos por ser o método mais barato. Tal diagnóstico é baseado nos sinais e sintomas apresentados pelos pacientes. Os sintomas apresentados em uma infecção por malária são inespecíficos e variáveis, comuns em outras infecções bacterianas ou virais como febre, náusea, vômito e diarreia. A inespecificidade dos sintomas prejudica a distinção da malária de outras causas de febre como dengue, febre de Chikungunya e febre por Zika Vírus prejudicando o diagnóstico clínico. É comum em regiões endêmicas o paciente com febre não-malárica ser tratado com antimalárico, contribuindo assim para o aumento da resistência aos antimaláricos existentes(TANGPUKDEE *et al.*, 2009).

1.5.2 Diagnóstico Laboratorial da Malária

O diagnóstico laboratorial da malária é realizado por diferentes técnicas, desde microscopia óptica do esfregaço sanguíneo utilizando sangue periférico corados com Giemsa ou outrastécnicas de coloração, como teste quantitativo de buffy coat (QBC), teste de

diagnóstico rápido (RDT) a exemplo do OPtiMAL, ICT, ParaHIT-f até métodos de diagnóstico molecular, como a reação em cadeia da polimerase (PCR). Os diferentes métodos possuem características peculiares e vantagens e desvantagens relacionados à sensibilidade, especificidade, precisão, custo, intensidade de trabalho e à presença do executor treinado (TANGPUKDEE *et al.*, 2009).

A microscopia usando esfregaço sanguíneo fino ou grosso em lâmina de vidro corado utilizando a coloração de Giemsa, Wright ou Field é o método considerado padrão ouro para diagnóstico laboratorial da malária. A gota espessa do sangue periférico corada com Giemsa é considerado um teste de triagem para malária, já o esfregaço sanguíneo que forma um filme de sangue bem fino é utilizado para confirmação da espécie (TANGPUKDEE *et al.*, 2009).

As vantagens da técnica é o baixo custo, simplicidade de execução, capacidade de qualificar e quantificar a espécie, que são os parâmetros essenciais para o manejo da malária e contribuem para a ampla aceitação. As desvantagens do método estão relacionadas ao trabalho demandado para a coloração e interpretação, fonte de energia elétrica, equipamentos adequados além da imprescindível presença de um microscopista treinado, a técnica tem limitações como baixa sensibilidade para a detecção e identificação de espécies em pacientes com baixa parasitemia ou em infecções de malárias mistas. Estudos indicam que um microscopista especialista consegue detectar até 5 parasitas/ μ l, já um microscopista inexperiente detecta apenas 50-100 parasitas/ μ l, o que provavelmente provoca uma subestimação da parasitemia podendo levar a subdoses de tratamento (TANGPUKDEE *et al.*, 2009).

Técnicas alternativas como a QBC são utilizadas para melhorar a detecção de parasitas, principalmente em estudos epidemiológicos e em populações assintomáticas em áreas endêmicas. Esta técnica simplifica o diagnóstico corando o do ácido desoxirribonucleico (DNA) do parasito com corantes fluorescentes para a sua posterior detecção em microscópio epifluorescente. Apesar de ser uma técnica rápida e sensível para o *P. falciparum* esta técnica tem a sensibilidade reduzida para as outras espécies de *Plasmodium*, além das desvantagens de ser cara em relação à microscopia tradicional e não indicada para quantificação dos parasitas (TANGPUKDEE *et al.*, 2009).

O teste de diagnóstico rápido (RDT) para malária surgiu principalmente para suprir as deficiências das técnicas de microscopia, sendo uma técnica fácil de realizar aumentando o acesso ao diagnóstico sem requerer energia elétrica e um microscopista treinado. Hoje existem mais de 80 RDT's para malária e são disponibilizados gratuitamente em 88 países. A técnica baseia-se na detecção do antígeno da malária no sangue por imunocromatografia contendo anticorpos antimaláricos específicos. Os RDT's para malária em sua grande maioria contêm os

“anticorpos panmaláricos” são anticorpos de detecção qualitativa da malária com as aldolase ou lactato desidrogenase (LDH) comuns para todas as espécies de *Plasmodium*. Há também testes rápidos específicos para a detecção do *P. falciparum* contendo anticorpos com a proteína histidinérgica 2 (HRP-2). Os desempenhos relatados pelos RDT’s para detecção de malária são excelentes, principalmente por estender o diagnóstico em áreas remotas, no entanto, em áreas endêmicas já foram relatados grandes variações de sensibilidade por apresentar limitações em detectar infecções com baixo nível de parasitemia, ou os estágios hepático de *P. vivax* e *P. ovale* levando a OMS recomendar a utilização em conjunto com outros métodos como a microscopia para certificar os resultados (WHO,2015) (TANGPUKDEE *et al.*, 2009; SINGH; DANESHVAR, 2013; HEMINGWAY *et al.*, 2016).

Os métodos de detecções moleculares são mais sensíveis e específicos que a microscopia ou RDT’s para malária, sem variação subjetiva, sendo capaz de detectar a parasitemia de baixa densidade. As principais técnicas utilizadas são: técnicas de PCR, de amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP), microarranjo, espectrometria de massa (MS) e citometria de fluxo (FCM). As técnicas de diagnóstico molecular não são práticas e apropriadas para o diagnóstico clínico de rotina, principalmente pelo alto custo agregado (TANGPUKDEE *et al.*, 2009; HEMINGWAY *et al.*, 2016).

1.6 DROGAS ANTIMALÁRICAS

O desenvolvimento de novas drogas é um procedimento longo e caro, raramente se investe em drogas para o tratamento de doenças tropicais, desse modo, entre 1975-1999 apenas 4 antimaláricos foram registrados no mundo. A soma dos gastos com medicamentos, vacinas e pesquisas básicas é de somente US \$ 550 milhões por ano aproximadamente. Nesse contexto, é importante o conhecimento da medicina tradicional a fim de buscar novas moléculas bioativas para a produção semissintética ou sintética de novas drogas (CUI *et al.*, 2015; HEMINGWAY *et al.*, 2016; MELO *et al.*, 2017).

Os fármacos antimaláricos devem atuar em todas as fases do ciclo de vida do parasito, no entanto, em sua maioria atua sobre o ciclo eritrocítico, ou seja, na fase esquizogônica em que apresenta maior susceptibilidade as drogas, sobretudo, aos derivados da artemisinina. Podem ser classificados pelos seus grupos químicos em: arylaminoálcoois, as 4-aminoquinolinas, 8-aminoquinolinas, peróxidos de lactona sesquiterpênica, naftoquinonas e antibióticos. (OLIVEIRA *et al.*, 2014; CUI *et al.*, 2015; SHI *et al.*, 2015). Ou pelos seus mecanismo de ação, em dois grandes grupos: Alcalóides derivados da cinchona que interferem no metabolismo da glicose e na habilidade do parasito na degradação da hemoglobina, impedido

a obtenção de energia ou provocando a sua intoxicação com altos níveis de ferriprotoporfirina-IX. É o segundo grupo que abrange as pirimidinas e biguanidas que interferem na síntese do DNA e de aminoácidos através da interferência da síntese do ácido tetra-hidrofólico (FRANÇA et al. 2008).

A quinina faz parte da família das quinolinas é amedicamentomais antigoutilizadono tratamento da malária, atua como esquizonticida eritrocítico rápido impedindo a formação dos gamétocitos nas espécies *P. vivax*, *P. ovale* e *P. malariae*. É usada com frequência apenas em casos de malária grave por causa de sua baixa tolerabilidade e efeitos adversos que impossibilitam a adesão ao tratamento nos casos de malária não complicada. (CUI et al., 2015).

As 4-aminoquinolinas, como a cloroquina, foram utilizadas como droga padrão no tratamento da malária por muitos anos. No entanto, não são recomendadas para o tratamento de malária aguda e/ou em infecções por *P. falciparum* devido a presença de parasitas resistentes a esses fármacos. Ademais as 8-aminoquinolinas, como a primaquina, possuem atividades contra o estágio eritrocitário, são utilizadas com finalidade de eliminar o parasito no estágio hepático, além disso, agem sobre formas como hipnozoítas e gametócitos sendo o mais indicado para tratamento de infecções pelo *P. vivax* se descartado o risco de anemia hemolítica aguda em pacientes com deficiência de G6PD (CUI et al., 2015; HEMINGWAY et al., 2016).

Em áreas que apresentam prevalência de infecções por *P. vivax* é recomendado pela OMS a utilização de cloroquina e primaquina, como fármacos de primeira linha. Entretanto, devido ao aumento na resistência a esses fármacos no mundo, como ocorrido na Indonésia, tem-se utilizado a artemisinina em combinação com mefloquina, piperaquina, amodiaquina ou lumefantrina formando a *Artemisinin Combined Therapy* (ACT). (OLIVEIRA et al., 2014; CUI et al., 2015).

A combinação Sulfadoxina e a pirimetamina são utilizadas em vários países no tratamento da malária, os inibidores da via dos folatos agem sobre enzimas essenciais ao metabolismo do parasito, como a dihidropteroato sintase (DHPS) e dihidrofolato redutase (DHFR), embora a eficácia seja limitada, em função do rápido desenvolvimento de resistência (OLIVEIRA et al., 2014; CUI et al., 2015).

A resistência do plasmódio ocorre, sobretudo, em virtude do polimorfismo genético oriundo da seleção pelo uso de antimaláricos. Desse modo ocorrem mudanças na estrutura de enzimas mediadas por genes, como na DHPS e DHFR, com consequente perda de afinidade pelo fármaco. Ocorre também o polimorfismo em transportadores da membrana plasmática que realizam o refluxo do fármaco e, conseqüentemente, a redução da concentração intracelular da droga (BIOT et al., 2012; CUI et al., 2015).

Além de tudo, em cinco países do Sudeste Asiático já detectaram parasitas resistentes à cloroquina, quinina, mefloquina, artemisinina e as ACTs. Dentre os fatores relacionados estão a expressão de genes que induzem a síntese de proteínas com propriedades pró-oxidantes antagonizando os efeitos dos fármacos antimaláricos. Portanto, a expansão de plasmódios resistente a artemisinina pode ser catastrófica na medida em que ocorre a propagação da resistência para áreas como a África Subsaariana ou no subcontinente indiano, onde as taxas de transmissão, morbidade e mortalidade são elevadas (FAIRHURST; DONDORP, 2016; HEMINGWAY *et al.*, 2016). A resistência do *Plasmodium* aos medicamentos não é o único fator que preocupa em relação à malária, a plasticidade do mosquito que já apresenta resistência aos inseticidas é um agravamento para a disseminação da malária. Na África já foi identificada a resistência do mosquito a dois ou mais inseticidas (HEMINGWAY *et al.*, 2016).

1.6.1 Derivados da artemisinina

Atualmente a OMS recomenda a combinação de fármacos derivados da artemisinina junto a um antimalárico de meia-vida longa com diferente mecanismo de ação. Desse modo, em casos de malária não complicada, adultos e crianças, com exceção de grávidas no primeiro trimestre de gestação, utilizam como primeira escolha a combinação de artemeter e lumefantrina, e também outras como artesunato e amodiaquina ou mefloquina (WHO, 2015).

As lactonas sesquiterpênicas endoperóxidos têm atraído interesse nas últimas décadas devido ao seu potencial como antimalárico. Nesse contexto o artesunato, um derivado da artemisinina, vem sendo usado como droga de primeira escolha no tratamento da malária grave, indicado para crianças, grávidas e lactantes por via intravenosa ou intramuscular por no mínimo 24h. Entretanto, casos em que o artesunato não estiver disponível por via parenteral utiliza-se, preferencialmente, o artemeter (WHO, 2015).

Durante a fase eritrocítica a hemoglobina no interior das hemácias é degradada por uma série de enzimas proteases. Esse catabolismo leva à liberação de peptídeos e aminoácidos para o metabolismo do parasito. Contudo, durante o processo ocorre a formação da hematina potencialmente tóxica ao parasito, em função disso, o parasito dispõe de mecanismos enzimáticos que promovem a conversão da hematina em dímeros insolúveis e atóxicos de hemozoína (O'NEILL *et al.*, 2010).

O catabolismo de componentes celulares pelo parasito leva hemácias infectadas a apresentarem alto nível de estresse oxidativo, visto que, ocorre o aumento de radicais livres intracelulares e peroxidação lipídica. Dessa maneira, hemácias infectadas pelo parasito

apresentam suscetibilidade à artemisinina e derivados, uma vez que, são bioativados na presença de compostos redutores, que podem doar elétrons, como o ferro (SHI *et al.*, 2015).

Portanto, a artemisinina e seus derivados apresentam seletividade para a fase eritrocítica, ou seja, a fase esporogônica. Esses fármacos possuem em sua estrutura uma lactona endoperóxica que ao ser reduzida pelo ferro (Fe^{2+}) livre ou ligado à hematina leva a abertura do anel e, por conseguinte, a formação de radical oxigênio e em seguida rearranjo a radicais livres de carbono. Esses radicais são metabólitos nucleofílicos que promovem a alquilação de macromoléculas contendo grupos ou centros eletrofílicos, tal como sulfidrilas, carbonilas e carboxilas, que levam a morte do parasito (O'NEILL *et al.*, 2010; SHI *et al.*, 2015).

1.6.2 Quinolinas

A quinina é uma amino alcaloide encontrada na casca da árvore de *Chichona*, sendo uma importante droga antimalárica mesmo 400 anos depois de documentada sua eficácia. Até o ano de 1920 foi a principal droga utilizada no tratamento da malária, quando substituída por drogas semissintéticas mais efetivas como a cloroquina que foi amplamente usada nos anos 40. Apresenta rápida ação esquizante contra o plasmódio no ciclo eritrocítico, além de possuir atividade contra gametócitos de *P. malariae*, no entanto, não afeta *P. falciparum* (ACHAN *et al.*, 2011).

Estudos demonstram que derivados quinolínicos contendo o farmacóforo 4-aminoquinolinas, como cloroquina e amodiaquina, e 8-aminoquinolinas, como primaquina, formam complexos com a hematina, portanto, têm como alvo o catabolismo da hemoglobina pelo parasito. Desse modo, esses fármacos impedem a desintoxicação da hematina de diversas formas, como pela interação com a superfície dos cristais de hemozoína impedindo o crescimento do mesmo e pela complexação com o grupo heme inibindo a formação dos dímeros e, como resultado, alongação da hemozoína. Nesse sentido, ao inibir a formação da hemozoína ocorre o acúmulo de hematina a níveis tóxicos e, conseqüentemente, leva a morte do parasito (BIOT *et al.*, 2012).

1.6.3 Antifolatos

As drogas que agem sobre a via de síntese do ácido fólico são usadas como agente terapêutico no tratamento de grande variedade de patógenos. O folato é importante para o

crescimento e desenvolvimento celular, visto que são essenciais para a divisão celular e síntese de proteínas(HEINBERG; KIRKMAN, 2015).

Além disso, são necessários para a replicação do DNA do parasito, já que é matéria prima para produção das bases púricas guanina e adenina. A DHPS é a terceira enzima na via dos folatos, sendo a responsável por combinar a pteridina com o ácido para-amino benzoico (PABA) e forma dihidopteroato. Dessa forma, análogos estruturais do PABA, como a sulfadoxina, inibem a DHPS reduzindo os níveis de ácido fólico e, conseqüentemente, a velocidade de crescimento do parasito. Entretanto, o plasmódio pode sobreviver pela captação do folato exógeno, desse modo são utilizados fármacos que inibem a última enzima dessa via, a DHFR(HEINBERG; KIRKMAN, 2015).

Como antimaláricos os antifolatos são bem tolerados, além do mais apresentam efeito sinérgico com outros antifolatos que agem por vias diferentes. Em razão disso, são comumente usados inibidores da DHFR como pirimetamina, cloroguanida e dapsona, em combinação com inibidores da DHPS, como sulfadoxina. Contudo, os antifolatos induzem rápida resistência que persiste mesmo com a suspensão do fármaco em razão de mutações nas enzimas DHFR e DHPS com conseqüente redução da atividade antimalárica(BIOT *et al.*, 2012).

A medicina popular possui uma contribuição indiscutível frente ao tratamento da malária como por exemplo, a quilolinas e as artemisininas que foram descobertas de produtos antimaláricos naturais (Rosenthal, 2003). Do extrato da casca da *Cinchona*, utilizada desde o século XVII, foi isolado o alcaloide quinina, que apesar da alta toxicidade é utilizado até hoje para o tratamento da doença. A artemisinina é derivada de pequenas modificações químicas do produto natural isolada da espécie *Artemisia annua*,ela foi pesquisada a partir do uso milenar na China (CAMARGO, 1995; ROSENTHAL, 2003).

1.7 PLANTAS MEDICINAIS

Plantas medicinais e seus produtos derivados são utilizados com a finalidade de tratamento, cura e prevenção de doenças pela medicina popular. O conhecimento da eficácia das plantas medicinais possui diversas influências culturais sendo uma prática remota com indícios da utilização datados de 500 a. C em textos chineses(FIRMO *et al.*, 2012).

A OMS estipula que 80% da população mundial utilizam plantas medicinais como recurso terapêutico, no entanto a grande maioria dessas plantas é utilizada sem nenhum conhecimento científico comprovado, sendo necessária a realização de estudos que comprovem

a eficácia terapêutica, a toxicidade, contraindicações e interações desses produtos naturais. (FIRMO *et al.*, 2012; MELO *et al.*, 2017).

No Brasil, há um incentivo à utilização de plantas medicinais, atualmente existem 71 plantas na lista de interesse do SUS que apresentam potencial para gerar produtos que possam atender as doenças comuns do território nacional. Divulgado pelo Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos do Ministério da Saúde a lista tem como objetivo orientar a produção de fitoterápicos com baixo custo econômico que possam ser distribuído no SUS (BRASIL, 2009).

Nas abordagens etnobotânicas, o conhecimento tradicional direciona pesquisas e valida informações populares de interesse da indústria farmacêutica para descoberta e desenvolvimento de novas drogas, abreviando o tempo de estudo e reduzindo os gastos da pesquisa (DE ALMEIDA, 2003; FIRMO *et al.*, 2012).

Dentre as doenças tratadas por plantas medicinais estão as parasitárias. Melo *et al.*, (2017) identificou 67 espécies de plantas usadas para o tratamento de parasitose, distribuído em 43 famílias, sendo *Leguminosae*, *Meliaceae*, *Solanaceae*, *Compositae* e *Euphorbiaceae* as mais citadas no estudo. A malária foi a doença parasitária com maior número de indicações de plantas medicinais para o tratamento.

A medicina tradicional constitui uma importante ferramenta na busca de novas moléculas bioativas para a produção de fármacos, semissintéticos ou sintéticos com maior eficácia e menos tóxicos ao organismo humano. Essas buscas têm se concentrado nos produtos naturais e a floresta Amazônica tem se destacado por apresentar a maior biodiversidade do planeta (ROSENTHAL, 2003; MELO *et al.*, 2017).

Nesse contexto, a flora brasileira, especialmente a diversidade de espécies de plantas na Amazônia, é uma grande fonte inexplorada com potencial para a investigação de novos produtos antimaláricos naturais. Uma das plantas utilizadas com a finalidade medicinal é a *Cyperus articulatus* L. objeto de estudo desta pesquisa (ROSENTHAL, 2003; MELO *et al.*, 2017).

Dentre as espécies utilizadas com finalidade terapêutica na Amazônia, destaca-se *C. articulatus* L. pertencente à família Cyperaceae, no Brasil é popularmente conhecida como priprioca e é utilizada tradicionalmente como sedativa, anticonvulsivante, anti-inflamatória, analgésica e também no tratamento da malária (ZOGHBI *et al.*, 2008).

Figura 4- Plantação de priprioca (*Cyperus articulatus*) na fazenda experimental da UFOPA.



Fonte: Próprio autor.

1.7.1 *Cyperus articulatus*

A família Cyperaceae Juss. é composta por 5.000 espécies agrupadas em quatro subfamília, 14 tribos e distribuída em 104 gêneros apresentando distribuição cosmopolita e ocorrendo em locais úmidos, sendo a terceira maior família monocotiledônea atrás apenas da Orchidaceae e Poaceae (GOETGHEBEUR, 1998). No Brasil, Alves, (2009) catalogou 678 espécies distribuídas em 42 gêneros, representando cerca de 15% do total de espécies e 40% do total de gêneros da família de ocorrência mundial .

C. articulatus L., pertence à família Cyperaceae, é uma espécie herbácea quanto a morfologia, possui haste eretocilíndricas e raízes verdes, finas e resistentes a rizomatosas (Sterly e Bouquet, 1971; Davidse, 1994). Na região do Gabão, Congo e Benin suas raízes são utilizadas com finalidade terapêutica para doenças como malária, infecções respiratórias, enxaquecas e epilepsia (STERLY; BOUQUET, 1971).

Figura5- Rizoma e tubérculo de *Cyperus articulatus*



Fonte: Próprio autor.

Zoghbi, *et al.*, (2008) destaca o crescente interesse para estudos com *C. articulatus* nos últimos anos por causa do aroma agradável do óleo volátil obtido a partir do rizoma da planta, representando uma fonte de matéria prima da amazônia para indústria de perfumes (ZOGHBI, M. *et al.*, 2008)

Nyasse *et al.*, (1988) relatou os principais componentes químicos do extrato de *C. articulatus* como: monocíclico sesquiterpênicadiketona, mandassidione, mustakona e isopatchoul-4(5)en-3-ona. Rakotonirina, (2001) descreveu a presença de flavonóides, saponinas, açúcares, triterpenos e poliuronides na composição química do extrato aquoso.

Os principais componentes do óleo de rizomas de *C. articulatus* cultivados do Pará foram a mustakona (14,5%), o óxido de cariofileno (10,1%), o α -pineno (6,5%), o myrtenal + myrtenol (5,8%) e ledol (4,6%) (Zoghbi *et al.*, 2006).

1.7.2 Propriedades medicinais de *C. articulatus*

As propriedades medicinais sobre as espécies de *C. articulatus* são inúmeras, a tabela 1 mostra alguns autores que identificaram as suas propriedades medicinais.

Tabela 1- Relação das propriedades medicinais de *C. articulatus*

AUTORES	PROPRIEDADE MEDICINAL
(Rakotonirina <i>et al.</i> , 2001)	Propriedades sedativas

(Bum <i>et al.</i> , 2001; Bum <i>et al.</i> , 2003)	Atividade anticonvulsivante
(Duarte <i>et al.</i> , 2005)	Atividade antifúngica
(Bum <i>et al.</i> , 1996)	Feito antiepilépticos
(Rukunga <i>et al.</i> , 2008)	Atividade antiplasmódica
(Metuge <i>et al.</i> , 2014)	Atividade anticercária
(Mongelli <i>et al.</i> , 1994; Oladosu <i>et al.</i> , 2011; Azzaz <i>et al.</i> , 2014)	Atividade antibacteriana
(Azzaz <i>et al.</i> , 2014)	Atividade antioxidante

Fonte: Próprio autor.

A propriedade tóxica do extrato de *C. articulatus* foi avaliada por Desmarchelier *et al.*, (1996) e a hepatoproteção frente a lesões induzidas por paracetamol em ratos por Datta *et al.*, (2013). Oladosu *et al.*, (2011) avaliou a propriedade medicinal do óleo essencial de duas variedades de *C. articulatus* L. mediante algumas linhagens de bactérias clínicas, sendo ativo para *Bacillus megaterium*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus epidermidis* e *Bacillus cereus*. Duarte *et al.*, (2005) relatou a atividade antifúngica sobre *Candida albicans*.

Mongelli *et al.*, (1994) destacou a atividade antimicrobiana do extrato *C. articulatus* obtido através de decocção, onde o mesmo inibiu parcialmente o crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* e completamente o crescimento de *S. aureus* pelo método de "stroke" em placas de ágar. Rakotonirina *et al.*, (2001) relatou sua possível propriedade sedativa. Rukunga *et al.*, (2008) demonstrou as propriedades antiparasitárias in vitro para *P. falciparum* de dois sesquiterpenos, corimbolona e mustacona, isolados a partir do extrato clorofórmio dos rizomas de *C. articulatus*.

2 JUSTIFICATIVA

A malária é uma doença tropical negligenciada e representa um problema de saúde mundial, sendo endêmica em mais de 90 países. Apesar de estar em declínio no cenário mundial, desperta grandes preocupações quanto ao aumento dos números notificados no Brasil. A região Amazônica apresenta condições favoráveis para o desenvolvimento do vetor, concentrando, dessa forma, os números de casos diagnosticados do país. O Pará é o segundo Estado dessa região com maior número de infecções por malária. Sem uma vacina, as estratégias para o controle utilizada é a proteção individual contra a picada dos vetores e o tratamento quimioterápico. Os medicamentos antimaláricos existentes são limitados e vêm tornando-se ineficientes frente à expansão de plasmódios resistentes, representando uma ameaça no controle da doença, além da elevada toxicidade ao organismo. Na região Amazônica o tratamento quimioterápico para a malária é de difícil acesso, este cenário justifica as razões pelas quais, utilização de plantas medicinais apresenta-se como alternativa viável e está presente no cotidiano da população. As abordagens etnobotânicas do conhecimento tradicional direcionam as pesquisas para o desenvolvimento de novas moléculas bioativas que podem levar a produção de fármacos semissintéticos ou sintéticos com maior eficácia e sem grandes prejuízos ao organismo humano. Nesse contexto, a flora brasileira, especialmente a diversidade de espécies de plantas na Amazônia, é uma grande fonte inexplorada com potencial para a investigação. Uma das plantas utilizadas com a finalidade medicinal é a *Cyperus articulatus* L. objeto de estudo desta pesquisa que vem corroborar com outros estudos na pesquisa de novas moléculas bioativas com atividade antimalárica.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antiplasmódica e antimalárica do óleo essencial de *C. articulatus* L. em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar quimicamente o óleo essencial de *C. articulatus* L.;
- Avaliar a toxicidade aguda *in vivo* e a citotoxicidade em cultura celular Wi26VA-4 do óleo essencial de *C. articulatus* L.;
- Avaliar a atividade antiplasmódica *in vitro* do óleo essencial de *C. articulatus* L.;
- Verificar a atividade antimalárica do óleo essencial de *C. articulatus* L. pelo seu efeito na redução da parasitemia, em camundongos com malária;
- Analisar a curva de sobrevivência dos animais infectados pelo *P. berghei* e tratados com o óleo essencial de *C. articulatus* L.;
- Avaliar os parâmetros hematológicos dos animais infectados pelo *P. berghei* nos animais não tratados e tratados com o óleo essencial de *C. articulatus* L.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

Os rizomas da espécie *C. articulatus* L. foram coletados na região do Tabocal no município de Santarém, Pará, Brasil (-54°43'00,10"W e -02°37'41,10"S) na rodovia BR-163, Km 23. A espécie foi identificada pelo botânico Dr. Antônio Elielson Sousa da Rocha e uma exsicata foi depositado sob o registro de número MG-207174 no Paraense Emilio Goeldi (MPEG).

4.2 EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *C. articulatus*

Foram coletados 5 kg de rizomas de *C. articulatus*. Após a coleta os rizomas foram submetidos à lavagem em água corrente, secos por um período de 3 dias consecutivos e moídos em moinho de facas em ambiente aberto. Após o período de secagem o material triturado foi submetido à hidrodestilação por arraste a vapor, em uma dorna de 150 L, com uma duração de 4 h. O rendimento de OECA foi medido em g/g de peso fresco, calculado por regra de três simples.

4.3 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DO OECA

A análise da composição química do óleo essencial de *Cyperus articulatus* (OECA) foi realizada em um cromatografia a gás Agilent, modelo HP-6890 equipado com um detector seletivo de massas Agilent, modelo HP-5975 utilizando uma coluna capilar HP-5MS (30m x 0,25mm x 0,25µm) nas seguintes condições: temperatura do injetor = 250°C, coluna = 80°C, taxa de aquecimento de 5°C/min até 280°C (20 min) e detector = 300°C. Foi utilizado hélio como gás de arraste numa vazão de 1mL/min e detector seletivo de massas operando a 70 eV, m/z = 30 a 500 u.m.a. O OECA foi solubilizado em acetato de etila na concentração de 20 mg/ml e a identificação dos compostos do óleo foi realizada através da comparação com a biblioteca eletrônica do equipamento (NIST-11).

4.4 CULTIVO DE CÉLULAS WI 26VA-4

A linhagem celular WI 26VA-4, fibroblasto de pulmão humano (ATCC#: CCL-75) foi cultivada a partir de ampola criopreservada de um cultivo originalmente cedido pela Dra.

Luciana Maria Silva, da Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte, Minas Gerais. As células foram descongeladas a 37°C e seu conteúdo transferido para um tubo de 50ml com 20ml de meio RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) incompleto. As células foram centrifugadas a 320g por 5min, o sobrenadante descartado e o sedimento ressuspensionado em meio RPMI suplementado com 5% de soro fetal bovino e 40mg/L de gentamicina (Sigma, São Paulo, Brasil). As células foram transferidas para garrafas de cultura de 200mL e acondicionadas em estufa a 5% de CO₂ a 37°C. O meio foi substituído a cada 2 dias, após confluência de 80% a cultura foi utilizada nos ensaios de citotoxicidade.

4.5 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE

As células em cultivo foram tripsinizadas com 1mL de tripsina (Sigma, São Paulo, Brasil), incubadas a 37°C por 5min, ressuspensionadas em 10mL de meio completo e centrifugadas a 320g por 5min. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensionado com meio completo. As células foram distribuídas em microplacas de 96 poços (4x10⁵ células/100µL por poço) e incubadas em estufa a 5% de CO₂ à 37°C por 24h para a adesão das células à placa. Em seguida foram adicionados 100µL de meio completo contendo diferentes concentrações dos compostos testados em triplicata. As placas foram incubadas por mais 24h. Ao final deste período, foram adicionados 20µL/poço de uma solução brometo 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazol (MTT) (Sigma, São Paulo, Brasil), um sal tetrazólico, na concentração de 5mg/ml em RPMI sem fenol. Após 3h de incubação com o MTT, o sobrenadante foi retirado e o corante formado diluído em dimetilsulfóxido (DMSO) no volume de 50µL/poço. As microplacas foram lidas em espectrofotômetro com filtro de 570nm. A dose letal mínima que inibe em 50% o crescimento das células (IC₅₀) na presença dos compostos testes e do antimalárico controle cloroquina foi determinada em comparação com células cultivadas sem a presença de compostos (considerada 100% de crescimento) (MOREIRA *et al.*, 2015).

4.6 CULTIVO *IN VITRO* DAS FASES INTRARITROCITÁRIAS DE *PLASMODIUM FALCIPARUM*

Os parasitos da cepa W2 (cloroquina-resistente) e 3D7 (cloroquina-sensível) foram cultivados em hemácias humanas *in vitro* sob condições estabelecidas por (Trager e Jensen, 1976), com pequenas modificações (Carvalho *et al.*, 1990; Andrade-Neto *et al.*, 2004). Os parasitos foram cultivados em placas de Petri com hematócrito a 5% usando meio de cultivo completo, isto é: RPMI 1640 suplementado com 25mM de HEPES, 21mM de bicarbonato de

sódio, 300 μ M de hipoxantina, 11 mM de glicose, 40 μ g/ml de gentamicina e 10% (v/v) de plasma humano inativado; todos os reagentes foram adquiridos da Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil). As placas foram mantidas à 37°C em dessecadores nos quais a concentração adequada de O₂ foi obtida pela combustão de uma vela, sendo realizadas trocas diárias de meio. A parasitemia foi monitorada diariamente em esfregaços sanguíneos, corados com Giemsa e lido por microscopia óptica (1000x).

4.7 SINCRONIZAÇÃO DO CULTIVO DE *PLASMODIUM FALCIPARUM*

Os parasitos de cultivo foram sincronizados pelo método do sorbitol (Lambros e Vanderberg, 1979). Os cultivos com predomínio de formas jovens (anéis), obtidas logo após a sincronização, foram utilizadas nos ensaios quimioterápicos.

4.8 TESTES ESQUIZONTICIDAS *IN VITRO* COM *PLASMODIUM FALCIPARUM*

Para a avaliação do óleo essencial de *C. articulatus*, culturas sincronizadas com 2% de parasitemia no estágio de anel e 2% de hematócrito foram distribuídas em microplacas de 96 poços. Após aproximadamente uma hora de incubação nas condições descritas no item 4.4, tempo necessário para a sedimentação das hemácias, acrescentou-se cada poço 25 μ l de meio RPMI, contendo diferentes concentrações da amostra de OECA em paralelo com antimaláricos de referência como a cloroquina em triplicatas. Após 24 e 48h de incubação dos parasitos da cepa W2 e 3D7 a 37°C em dessecador, o meio de cultura com ou sem adição dos compostos foi trocado em cada poço. Esfregaços sanguíneos de todas as amostras foram confeccionados após 72h, corados com Giemsa e examinados ao microscópio óptico para a determinação da parasitemia. A média da parasitemia calculada nos poços sem adição de compostos (6 poços), considerada como 100% de crescimento do parasito, foi comparada com as parasitemias nos poços que receberam os antimaláricos de referência e os compostos teste. A atividade dos compostos e do controle foi expressa como IC₅₀ (concentração que inibe 50% do crescimento do parasito) (CARVALHO *et al.*, 1990). Todos os experimentos foram realizados em triplicatas e a leitura através de lâminas codificadas.

Os dados obtidos foram classificados em: baixa atividade (IC₅₀>100), atividade moderada (100>IC₅₀>10) e elevada atividade (IC₅₀≤10) (OLIVEIRA *et al.*, 2014).

O Índice de Seletividade (IS), que corresponde à razão da atividade citotóxica em relação à atividade antimalárica, foi calculado segundo a fórmula abaixo:

$$IS = IC_{50} \text{ WI 26VA-4} / IC_{50} P. \textit{falciparum}$$

4.9 ANIMAIS

O experimento foi realizado com fêmeas de camundongos BALB/c saudáveis, com idade entre 30 a 60 dias e com variação máxima de 15% ($22,12 \pm 3.32$ g), provenientes do Biotério da Universidade Federal do Oeste do Pará – Campus Oriximiná, desde o nascimento. Os animais foram mantidos no alojamento de animais do laboratório de farmacologia do ISCO/UFOPA a uma temperatura controlada de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, sobre um ciclo claro-escuro de 12 horas, com ração balanceada (Labina®) e água *ad libitum*. O manejo e os cuidados com os animais seguiram os princípios éticos da experimentação animal segundo critérios estabelecidos pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade Federal do Oeste do Pará. O protocolo experimental foi submetido a esse Comitê e aprovado sob protocolo 02001/2015.

4.10 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA

A toxicidade oral aguda foi determinada utilizando o Guia OECD-423/2001 “Toxicidade Aguda de Classes” (GUIDELINE, 2001), no qual são utilizadas doses de 5, 50, 300 e 2000 mg/kg, e o número de 3 animais em cada grupo. A dose inicial selecionada foi de 5mg/kg, as próximas doses testadas foram selecionadas dependendo da mortalidade observada nas primeiras 24 h de exposição. Cada dose foi testada duas vezes e, finalmente, foi estimada a categoria toxicológica, segundo as especificações do Guia. O OEC foi solubilizado em Tween 80 a 4%, os animais do grupo Controle receberam somente solução salina com Tween 80 a 4%, as doses foram administradas por via oral. Os animais foram avaliados quanto a sua atividade geral, frêmito vocal, irritabilidade, reflexo, contorção, ataxia, tremores, convulsões, hipnose, anestesia, lacrimação, ptose, piloereção, hipotermia, respiração, cianose, hiperemia e morte depois de 30 min, 1h, 2h, 3h e 4h após a administração do óleo essencial de *C. articulatus*, a partir de então, diariamente até o 14^a dia. Todos os animais foram pesados antes da administração, no 7^o e 14^o dia.

4.11 INDUÇÃO DO MODELO EXPERIMENTAL

O ensaio foi realizado através do teste adaptado descrito por Peters(1985), onde o modelo de malária foi induzido a partir da inoculação via intraperitoneal de aproximadamente 10^6 eritrócitos parasitados com cepa *Plasmodiumberghei* (PbA) ANKA em camundongos fêmeas da linhagem BALB/c.

4.12 DESENHO EXPERIMENTAL DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE PARASITARIA

Os animais foram divididos em seis grupos experimentais de 8 animais. Grupo 1: Grupo Controle, os animais não foram infectados, mas receberam estímulo de tratamento com veículo, o PBS (Solução tampão Fosfato Salino). Este grupo serviu como parâmetro normal de referência para as análises hematológicas e bioquímicas realizadas. No segundo grupo, o Grupo 2, os animais foram infectados com o *P. berghei*. Estes animais receberam somente o estímulo de tratamento com veículo PBS. Este grupo serviu para análise das alterações que a malária pode provocar em animais infectados sem tratamento. No Grupo 3, o Grupo Artemisinina, os animais foram infectados com o *P. berghei* e receberam o tratamento com a Artemisinina 100 mg/kg/dia por via oral (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA). A Artemisinina é uma das drogas utilizadas no tratamento da malária em humanos e este grupo serviu de comparativo com os grupos de tratamento com o OECA. No Grupo 4, Grupo 5 e Grupo 6, os animais foram infectados com o *P. berghei* e foram tratados com as respectivas doses do OECA: 200, 100 e 10 mg/Kg/dia respectivamente, diluído em Tween 80 à 4% veiculado em PBS e administrado por via oral. As doses selecionadas corresponderam a 1/200, 1/20 e 1/10 da dose máxima testada no teste de toxicidade aguda.

Todos os tratamentos foram iniciados no 4º dia após a inoculação do plasmódio, neste dia foi realizada a primeira verificação da densidade parasitária para confirmação da infecção. Para a coleta de material biológico ao final do tratamento, os animais mantiveram a dieta rotineira, não fazendo o jejum habitual, pela fragilidade do estado malárico.

4.13 DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE PARASITARIA

A parasitemia foi verificada no 4º, 7º e 11º dias pós-inoculação, através do esfregaço sanguíneo e a leitura de 3000 eritrócitos em microscópio ótico (1000x) após a coloração de Giemsa. As porcentagens de parasitemia (2) e de supressão (3) foram determinadas utilizando modelo modificado proposto por Girma (2015):

$$\% \text{Parasitemia} = \frac{\text{número de eritrócitos infectados} \times 100}{\text{número total de eritrócitos}}$$

$$\% \text{Supressão} = \frac{\text{parasitemia do grupo não tratado} - \text{parasitemia grupo tratado}}{\text{parasitemia do grupo não tratado}} \times 100$$

4.14 ANÁLISE DE SOBREVIVÊNCIA DOS ANIMAIS

Em cada grupo experimental foram escolhidos aleatoriamente três animais para análise de sobrevivência. Os animais foram mantidos a uma temperatura controlada de 22 ± 2 ° C, sobre um ciclo claro-escuro de 12 horas, com ração balanceada (Labina®) e água *ad libitum*, até o óbito naturalmente.

4.15 PROCEDIMENTOS DE COLETA SANGUÍNEA

Ao final do período de tratamento os todos os grupos de animais foram anestesiados com uma associação de Xilazina e Ketamina. Após o processo de anestesia, os animais foram submetidos a uma punção cardíaca que permite a coleta obtenção de no mínimo de 1 ml de sangue, necessários para as análises bioquímicas.

4.16 PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS

Para análise hematológica foi realizado um hemograma ao final do tratamento no qual foram avaliados os seguintes parâmetros: Contagem total de eritrócitos (RBC); Quantificação de hemoglobina (HGB); Determinação do hematócrito (HCT); Números absolutos de leucócitos (WBC); Linfócitos; Monócitos; e Neutrófilos segmentados.

Para realização do hemograma foi utilizado um Contador automático de células sanguíneas, Modelo KT 6200 Genius realizado no laboratório de Sanidade Animal na UFOPA.

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados estatisticamente com o Software, São Diego, CA Prism 5.0® expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m.), quando duas médias pareadas foram comparadas, ou pela análise de variância (ANOVA) para múltiplas comparações seguida do teste de Tukey. $P < 0,05$ foi utilizado como nível de significância. Os valores de IC_{50} foram calculados usando o programa OriginPro8.0 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA).

6 RESULTADOS

6.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO OECA

O rendimento do OECA obtido após o processo de extração por arraste a vapor foi 0,6% (g/g). A caracterização química por GC-MS levou a identificação de 37 compostos terpênicos (Tabela 2), dos quais 9,96% são monoterpenos não-oxigenados, 5,03% monoterpenos oxigenados, 23,3% sesquiterpenos não-oxigenados e 41,5% sesquiterpenos oxigenados. Os compostos majoritários são mustacona (9,91%), ciccolorenono (7,42%), α -pineno (5,37%), α -copaeno (4,42%), α -selineno (4,38%) e *cis*-tujopseno (4,05%) (Tabela 2). Um total de 20,56% dos componentes não pôde ser identificado, pois não encontramos semelhança na comparação dos dados espectrais e de pesos moleculares com as referências da literatura e de bancos de dados existentes.

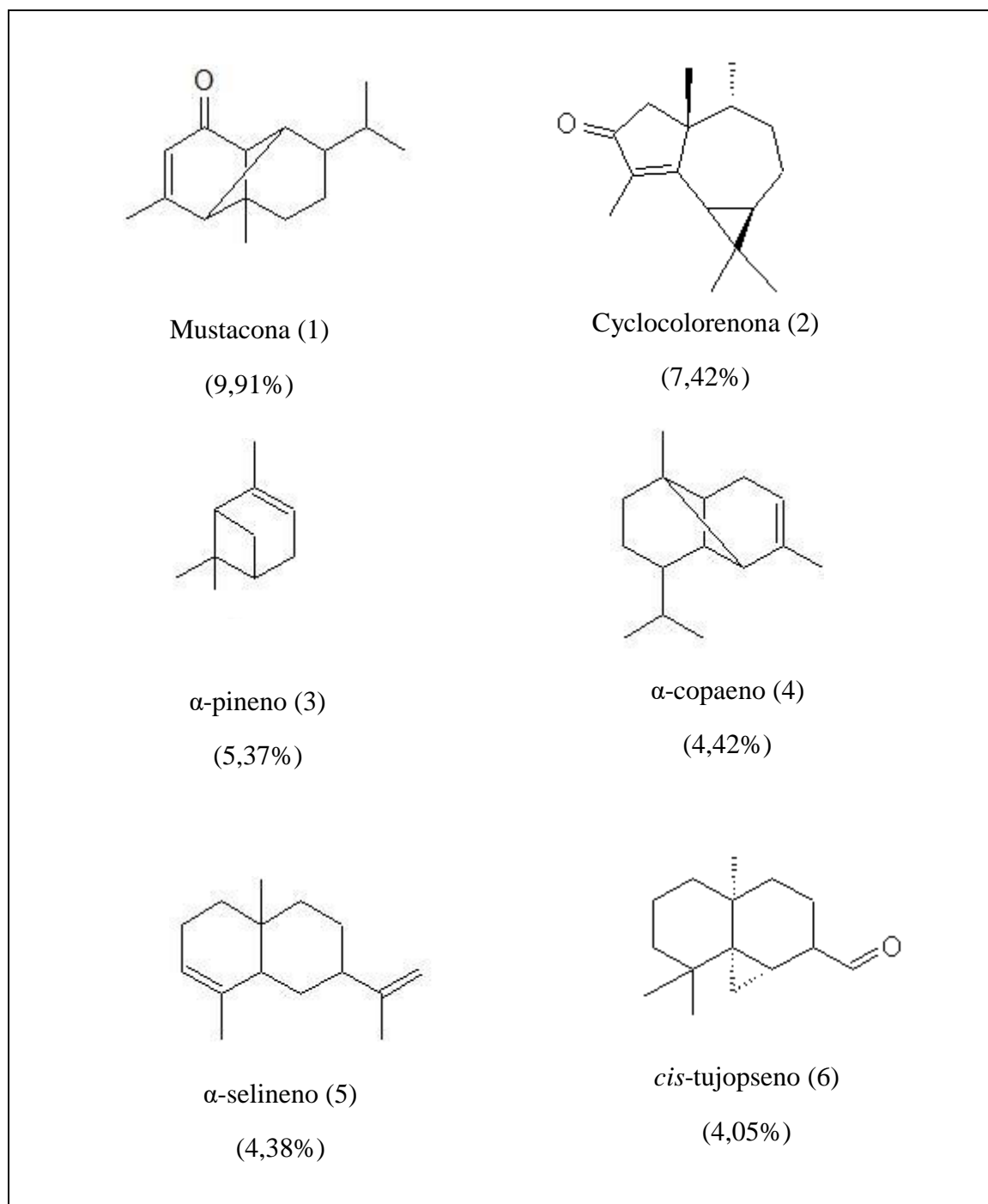
Tabela 2- Identificação da composição química do OECA por GC-MS.

tr (min)	IK*	Substâncias	% rel.
5.77	933	α -pineno	5.37
6.29	953	tuja-2,4(10)-dieno	0.42
6.93	977	β -pineno	3.07
8.39	1024	<i>p</i> -cimeno	0.50
8.53	1028	limoneno	0.60
12.13	1126	α -camfolenal	0.31
12.68	1140	<i>trans</i> -pinocarveol	1.44
13.60	1162	pinocarvona	0.52
13.83	1168	<i>p</i> -menta-1.5-dien-8-ol	0.60
15.01	1197	mirtenal	2.16
22.54	1376	α -copaeno	4.42
23.48	1398	copereno	1.70
23.74	1405	<i>cis</i> -tujopsadieno	1.18
25.08	1438	α -guaieno	0.72
25.89	1458	rotundeno	0.88
26.45	1472	β -selineno	0.31
26.52	1474	isolongifolene. 4.5-dehydro	0.54
26.63	1477	α -amorfenos	1.04

27.04	1487	α -selineno	4.38
27.37	1495	eudesma-4(14).7(11)-diene	0.96
27.81	1506	α -bulneseno	2.16
29.26	1543	α -calacoreno	1.16
30.50	1575	epóxido cedreno	2.53
30.73	1581	calameneno	1.32
30.82	1584	óxido de cariofileno	3.73
31.00	1588	spathulenol	2.82
31.19	1593	β -copaen-4- α -ol	1.37
31.79	1609	epóxido de humuleno	1.27
32.84	1638	eudesma-3,11-dien-5-ol	1.56
33.51	1656	pogostol	2.54
34.44	1681	mustacona	9.91
34.56	1684	cyperol	2.55
34.96	1695	cyperotundona	2.79
35.51	1711	<i>cis</i> -tujopseno	4.05
35.81	1719	14-hidroxi- α -humuleno	0.55
36.98	1753	ciccolorenona	7.42
37.63	1771	α -ciperona	0.59
Total identificado (%)			79.44

* Kovatz Index; **tr**tempo de retenção.

Figura6- Constituintes majoritários identificados e respectivas concentrações encontradas no óleo essencial de *Cyperus articulatus*.



6.2 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE ORAL AGUDA

No teste de toxicidade oral aguda na primeira dose (5,0 mg/kg), nenhum dos três animais expostos do grupo apresentaram alguma das alterações ou mortalidade indicadas pelo protocolo nas primeiras 4 h, assim como no período de 14 dias sucessivos repetiu-se o teste com o mesmo número de animais e concentração do OECA, confirmando o resultado anterior. Assim, as demais concentrações (50, 300 e 2000 mg/kg) do OECA foram administradas seguindo os mesmos procedimentos experimentais, e não foram observadas nenhuma alteração clínica e nem mortalidade em todas as doses estipuladas pelo guia OECD 423 (OECD, 2001). No acompanhamento da massa corporal quando aplicado o teste ANOVA não foram observadas diferenças significativas (Tabela 3), assim como não foram registrados morbidade ou quaisquer sinais visíveis de intoxicação norteados pelo teste, ficando os animais ativos e saudáveis.

Tabela3- Evolução da toxicidade oral aguda do OECA: média do peso corporal de camundongos BALB/c.

	Dosagem de OECA (mg/Kg)				
	Controle	5	50	300	2000
Dia 0	24,02±1,28	24,08±2,56	24,18±3,77	25,03±0,67	24,85±0,57
Dia 7	25,28±2,51	26,02±0,59	26,08±1,27	27,20±1,64	26,89±1,03
Dia 14	25,99±2,96	26,36±1,75	28,19±0,89	28,71±1,60	29,40±1,31

Nota: média do peso corporal (gramas±desvio padrão) é correspondente de n=6 para cada dosagem.

6.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMALÁRICA *IN VITRO*

O OECA foi testado *in vitro* contra duas cepas de *P. falciparum*, além de uma linhagem celular humana, a fim de se determinar sua atividade antimalárica e citotóxica (Tabela 4). No ensaio de viabilidade celular pelo método de MTT, o OECA apresentou o $IC_{50} > 100 \mu\text{g/ml}$. Os IC_{50} das cepas do *P. falciparum* tratadas com o óleo essencial foram $1,21 \mu\text{g/ml}$ para a cepa W2, e $2,3 \mu\text{g/ml}$ para a cepa 3D7. A cloroquina apresentou IC_{50} de $0,46 \mu\text{g/ml}$ e $0,21 \mu\text{g/ml}$ para cepas W2 e 3D7 respectivamente. O índice de Seletividade do OECA foi superior a 80 para cepa W2 e superior a 40 para a cepa 3D7 (Tabela 4).

Tabela4- Atividade antiplasmódica *in vitro*, citotoxicidade e índice de seletividade (IS) do OECA.

Amostras	$IC_{50} \pm DP (\mu\text{g/ml})$	IS
----------	-----------------------------------	----

	P.f. W2	P.f. 3D7	Wi 26VA-4	IC ₅₀ Wi 26VA-4 / IC ₅₀ P.f. W2	IC ₅₀ Wi 26VA-4 / IC ₅₀ P.f. 3D7
OECA	1,21±0,05	2,3±0,09	>100	>80	>40
Cloroquina	0,46±0,08	0,21±0,01	>100	>100	>200

* DP: Desvio-Padrão. **P.f.= *Plasmodiumfalciparum*

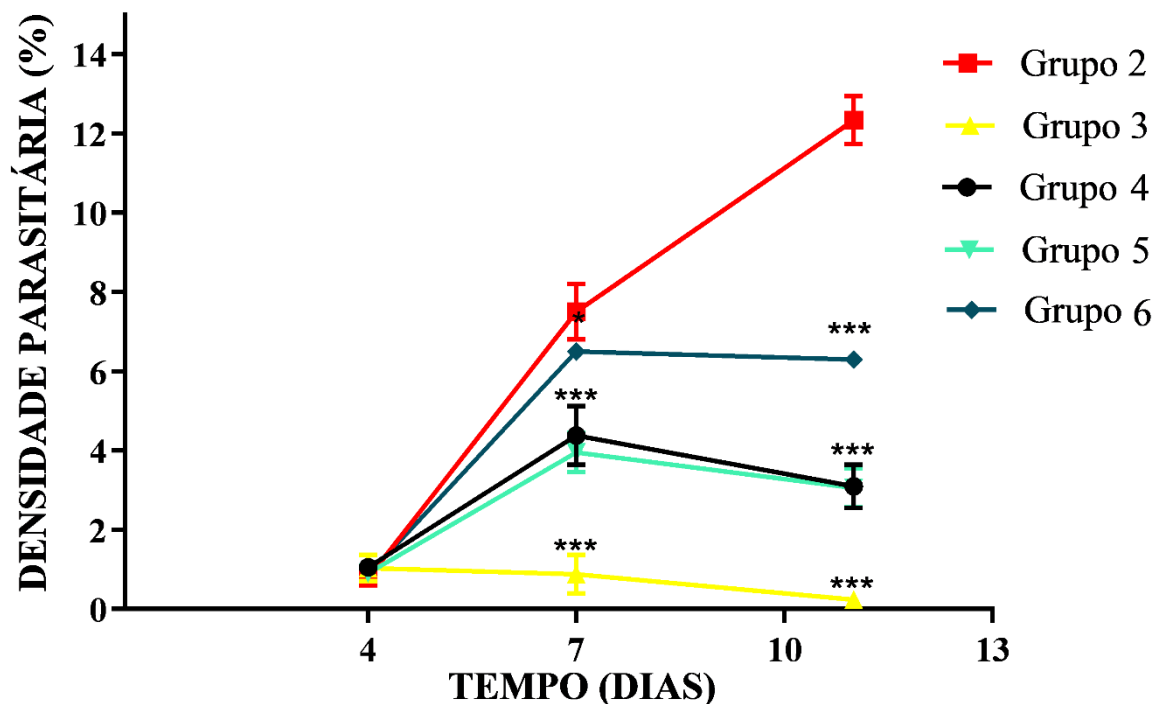
6.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMALÁRICA *IN VIVO*

6.4.1 Análise Quantitativa da Evolução da Parasitemia

O OECA, nas diferentes doses testadas, reduziu significativamente a parasitemia induzida pelo *P. berghei* (Figura 2). No 11º dia após a inoculação, os valores da supressão da parasitemia para os grupos 4, 5 e 6 nas doses de 200, 100 e 10 mg/Kg/dia foram de 75,17%, 74,77% e 48,94%, respectivamente. O tratamento com a artemisinina 100 mg/kg (Grupo 3) promoveu uma supressão de 100% dos parasitas. A maior supressão de parasitemia foi observada na dose de 200 mg/kg/dia em camundongos BALB/c. Observou-se que o percentual de supressão da parasitemia é diretamente proporcional ao aumento da concentração do OECA.

A análise quantitativa do número de parasitas nas amostras sanguíneas coletadas de todos os grupos infectados está representada do Figura 7.

Figura 7 - Evolução da parasitemia dos camundongos BALB/c infectados com *Plasmodium berghei*.



Cada ponto representa média \pm e.p.m. Legenda: Grupo 2 (malária não tratada); Grupo 3 (artemisinina 100 mg/kg/dia); Grupos 4, 5 e 6 (OECA 200, 100 e 10 mg/kg/dia). * $p < 0,05$ vs Grupo 2; *** $p < 0,001$ vs Grupo 2; (ANOVA, seguido de teste Tukey).

6.4.2 Avaliação dos Parâmetros Hematológicos

A análise hematológica da série vermelha está descrita na Tabela 5. No décimo dia de infecção, houve uma redução significativa ($p < 0,001$) do número total de hemácias no Grupo 2 (com a infecção do *P. berghei* sem tratamento) quando comparados ao Grupo 1 (sem infecção). Ademais, o Grupo 3 (recebeu tratamento com Artemisinina 100 mg) obteve aumento significativo destas células com $p < 0,001$ quando comparados com o Grupo 2. Os grupos 4 e 5 (*C. articulatus* 200 e 100 mg/kg/dia, respectivamente), apresentaram diferença significativa (** $p < 0,01$) e o Grupo 6 (10 mg/kg/dia) não apresentou diferença significativa deste parâmetro quando comparados com Grupo 2. Sendo que o número de hemácias nos grupos 3, 4 e 5, são semelhantes ao dos animais que não foram infectados (Grupo 1).

A concentração de hemoglobina visualizada na análise hematológica (Tabela 5) no décimo dia de infecção demonstra que houve uma redução significativa deste parâmetro ($p < 0,001$) do Grupo 2 quando comparado ao grupo Grupo 1. Quando avaliamos os resultados

do hematócrito e comparamos do Grupo 2 com o Grupo 3 podemos perceber que o tratamento leva a um aumento significativo ($p < 0,001$) nos valores de hemoglobina destes animais. Os grupos 4 e 5 (*C. articulatus* 200 e 100mg/kg/dia, respectivamente), apresentaram diferença significativa (** $p < 0,01$) e o Grupo 6 (10mg/kg/dia) não apresentou diferença significativa deste parâmetro quando comparados com Grupo 2.

O nível do hematócrito (Tabela 5) demonstra que houve uma redução significativa deste parâmetro ($p < 0,001$) do Grupo 2 quando comparados ao grupo Grupo 1. Quando avaliamos os resultados do hematócrito e comparamos o Grupo 2 com o grupo Grupo 3 podemos perceber que o tratamento leva a um aumento significativo ($p < 0,001$) percentual de hematócrito destes animais. O Grupo 4 (*C. articulatus* 200mg/kg/dia) apresentou diferença significativa (** $p < 0,01$), o Grupo 5 (100mg/kg/dia) apresentou diferença significativa (* $p < 0,05$), e o Grupo 6 (10mg/kg/dia) não apresentou diferença significativa deste parâmetro quando comparados com Grupo 2.

A quantificação de Plaqueta (Tabela 5) demonstra que houve uma redução significativa deste parâmetro ($p < 0,001$) do Grupo 2 quando comparados ao grupo Grupo 1. Ademais, o grupo 3 e 4 obtiveram o aumento significativo com $p < 0,001$, o Grupo 5 com $p < 0,05$ em comparação com os grupos 2. O Grupo 6 não apresentou diferença significativa deste parâmetro quando comparados com Grupo 2.

Tabela 5- Análise hematológica de grupos experimentais tratados com OECA e artemisinina no 11º dia após a infecção por *P. berghei* de camundongos BALB/c.

	Número de eritrócitos $10^6/\mu\text{l}$	Hemoglobina g/dL	Hematócrito %	Plaquetas $10^6/\mu\text{l}$
Grupo 1	9,48±0,49	14,46±1,21	49,5±1,16	792±22,3
Grupo 2	3,28±0,61###	6,16±0,99###	20,92±3,53###	282±37,06###
Grupo 3	10,04±2,03***	13,62±2,50***	48,06±8,3***	822±35,49***
Grupo 4	8,04±3,413**	6,94±0,85**	43,03±13,5**	616±86***
Grupo 5	7,23±2,60**	11,74±2,59**	38,1±11,44*	439±51,99*
Grupo 6	3,6±0,35	14,77±0,49	25,34±3,07	354±77,08

* P.b: *Plasmodium berghei*. Média ± SEM. Grupo 1 (controle), Grupo 2 (malária não tratada); Grupo 3 (artemisinina 100 mg kg⁻¹dia); Grupos 4, 5 e 6 (OECA 200, 100 e 10 mg kg⁻¹dia). ### Representa que houve uma diferença significativa ($p < 0,001$) nos parâmetros hematológicos dos animais do grupo quando comparado ao Grupo 1. * $p < 0,05$ vs Grupo 2; ** $p < 0,01$ vs Grupo 2; *** $p < 0,001$ vs Grupo 2 (ANOVA, seguido pelo teste de Tukey).

Como sumarizado na tabela 6, o número total de leucócitos, linfócitos, monócitos e neutrófilos segmentados teve um aumento significativo ($p < 0,001$) no Grupo 2 (com a infecção do *P. berghei* sem tratamento) quando comparados ao Grupo 1 (sem infecção). Todos os grupos tratados 3,4,5 e 6, apresentam redução significativa ($p < 0,001$) nesses valores quando comparados ao grupo 2.

Tabela6- Análise hematológica (Leucograma) de grupos experimentais tratados com OECA e artemisinina no 11º dia após a infecção por *P. berghei* de camundongos BALB/c.

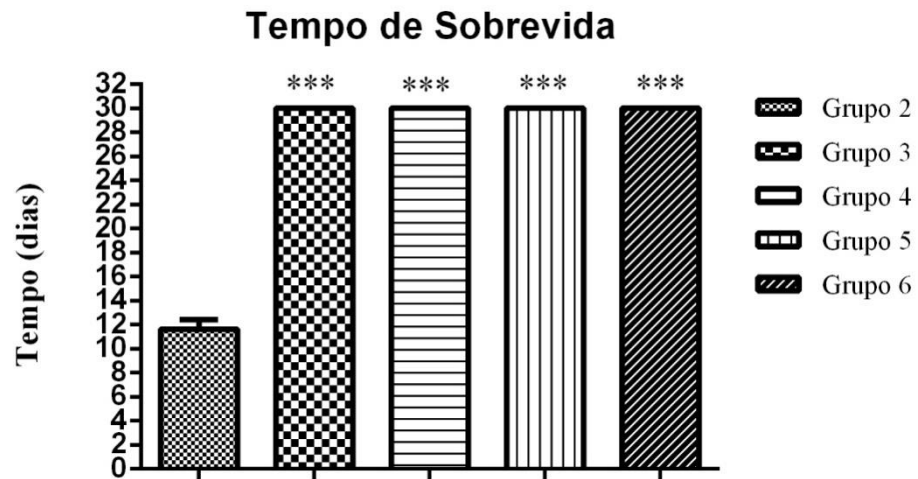
	Número total de leucócitos $10^6/\mu\text{l}$	Linfócitos $10^6/\mu\text{l}$	Monócitos $10^6/\mu\text{l}$	Neutrófilos segmentados $10^6/\mu\text{l}$
Grupo 1	5,55±0,78	2,58±0,64	0,65±0,10	2,174±1,16
Grupo 2	121,6±8,43###	89,51±2,88###	5,82±0,72###	24,27±6,27###
Grupo 3	6,21±0,30***	3,47±0,41***	0,65±0,09***	1,88±0,36***
Grupo 4	8,08±3,413***	5,59±0,88***	0,45±0,09***	1,84±0,57***
Grupo 5	10,36±1,37***	7,758±0,32***	0,76±0,02***	1,83±0,52***
Grupo 6	12,98±1,32***	8,44±10,23 ***	0,91±0,05***	2,72±0,86***

* *P.b*: *Plasmodium berghei*. Média ± SEM. Grupo 1 (controle), Grupo 2 (malária não tratada); Grupo 3 (artemisinina 100 mg kg⁻¹ dia); Grupos 4, 5 e 6 (OECA 200, 100 e 100 mg kg⁻¹ dia). ### Representa que houve uma diferença significativa ($p < 0,001$) nos parâmetros hematológicos dos animais quando comparado ao Grupo 1. * $p < 0,05$ vs Grupo 2; ** $p < 0,01$ vs Grupo 2; *** $p < 0,001$ vs Grupo 2 (ANOVA, seguido pelo teste de Tukey).

6.4.3 Avaliação do Tempo de Sobrevida dos Animais

A sobrevivência dos animais, após a inoculação do *Plasmodium berghei* analisado de acordo com a contagem de dias está descrito na figura 8. Todos grupos tratados 3,4,5 e 6, sobreviveram por um período que ultrapassou as 4 semanas de observação, contabilizando no total 30 dias. Os animais do Grupo 2 permaneceram vivos somente até no máximo no 13º dia após a infecção.

Figura8- Tempo de sobrevivência dos camundongos BALB/c infectados com *Plasmodium berghei*.



Cada barra representa o tempo de sobrevivência (dias). Grupo 1 (controle), Grupo 2 (malária não tratada); Grupo 3 (artemisinina 100 mg kg⁻¹ dia); Grupos 4, 5 e 6 (OECA 200, 100 e 10 mg kg⁻¹ dia).*** Representa que houve uma diferença significativa $p < 0,001$ vs Grupo 2 (ANOVA, seguido pelo teste de Tukey).

7 DISCUSSÃO

A partir de informações etnofarmacológicas de *Cyperus articulatus* para doenças parasitárias, incluindo a malária, avaliamos a atividade antiplasmódica e antimalárica do OECA obtido de rizomas desta planta cultivada em Santarém-Pa. A caracterização química, juntamente com a avaliação da atividade antimalárica e sua toxicidade, visa contribuir com o saber tradicional e corroborar com o estudo de suas propriedades farmacológicas (OLIVEIRA *et al.*, 2014). No presente estudo, verificou-se que o OECA apresenta como composto majoritário a mustacona. No teste *in vitro*, exibiu baixa citotoxicidade em linhagem humana Wi26VA-4 e alta atividade frente duas cepas de *P. falciparum* W2 e 3D7. Na avaliação *in vivo*, o OECA pode ser administrado com segurança nas doses avaliadas, apresentando baixa toxicidade aguda, além de significativa atividade na supressão da parasitemia em camundongos BALB/c infectados com *P. berghei* e dos efeitos hematológicos provocado pelo curso normal da patologia, apresentando eficácia similar a artemisinina.

Vários trabalhos descrevem os efeitos benéficos dos fitoterápicos no quadro clínico natural da malária (BALLAL *et al.*, 2011). Historicamente, os produtos naturais são as principais fontes para o desenvolvimento e produção de medicamentos antimaláricos, a exemplo da quinina encontrada na casca da *Cinchona* spp. (Rubiaceae) e a artemisinina isolada a partir de *Artemisia annua* L. (Asteraceae), que representam as principais substâncias antimaláricas naturais encontradas (Pohlit *et al.*, 2013). Entretanto, não encontramos na literatura nenhum trabalho que tenha investigado a atividade antiplasmódica e antimalárica da espécie *C. articulatus*.

Na região Amazônica, as plantas medicinais são amplamente utilizadas no tratamento da malária entre as populações rurais e ribeirinhas. Oliveira *et al.* (2014) encontrou 26 espécies de plantas da região amazônica distribuída em 12 famílias e 66 compostos com atividade antimalárica *in vitro* contra cepas 3D7, W2, FcB1, K1, D2, D2, D6, F32, FcM29. Martinez *et al.*, (2018) em um estudo de avaliação etnobotânica com pacientes que apresentavam infecção por malária na região amazônica, destacou a presença de 16 plantas pertencentes a 10 famílias (Arecaceae, Asteraceae, Caprifoliaceae, Costaceae, Cucurbiaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Lamiaceae, Rubiaceae, Solanaceae). A família Cyperaceae foi citada no estudo de Bussmann E Glenn (2010), no qual aborda tratamentos tradicionais para a malária e febre no norte do Peru. Na Guiné Equatorial, as folhas de priprioça são misturadas a outras plantas e utilizadas por curandeiros no tratamento de malária cerebral (Akendengue, 1992).

O óleo essencial foi obtido pelo método de hidrodestilação por arraste a vapor. O rendimento do óleo essencial *C. articulatus* resultou em um percentual de 0,6%. Zoghbi *et al.*, (2006) encontraram rendimentos semelhantes (0,9 a 1,6%) do rizoma de *C. articulatus* utilizando o mesmo método. Silva *et al.*, (2014), encontraram rendimento de 0,3 % utilizando a hidrodestilação como método de extração e rendimentos de 1,2-3,3% com extração por CO₂ pressurizado do óleo essencial de *C. articulatus*.

POHLIT *et al.*, (2013) relataram em seu estudo que os metabólicos secundários serão a fonte da próxima geração de antimaláricos. Investigamos a composição química do OECA e seus principais componentes são os monoterpenos α -pineno e β -pineno, além dos sesquiterpenos α -copaeno, α -selineno, mustacona, ciclocolorenono e *cis*-tujopseno (Tabela 2). Uma Composição química semelhante foi descrita por Zoghbi *et al.*, (2006) e Moura *et al.*, (2009), demonstrando que a composição química do OECA está de acordo com o perfil químico descrito na literatura. Zoghbi *et al.*, (2008) realizaram outro estudo sobre a composição química do óleo essencial dos rizomas de *C. articulatus* L. var. *nodosus* coletados em diferentes cidades do Pará, como Caratateua, Santarém Novo, Igarapé-Açu e Vigia, onde os principais componentes encontrados foram: α -pineno (3,6-25,3%), β -pineno (2,2-12,5%), *trans*-pinocarveol (2,1-5,4%), mirtenal + mirtenol (2,2-5,5%), α -copaeno (1,4-2,7%), cipereno (0,6-1,5%), β -selineno (0,9-2,5%), ledol (0,8-5,0), óxido de cariofileno (3,0-8,2), mustacona (3,3-9,8%), ciperotundona (2,5-4,0) e α -ciperona (3,3-8,9).

Em nosso estudo, a identificação dos componentes químicos presentes no OECA corrobora com os dados descritos na literatura, variando apenas na concentração dos componentes, sendo a mustacona o marcador químico do OECA. Entretanto, outras substâncias foram identificadas apenas na amostra OECA, como cyclocolorenone e *cis*-thujopsenal.

O sesquiterpeno mustacona, indicado como marcador químico da espécie, foi o componente químico majoritário do OECA (9,91%), em nosso estudo, assim como no trabalho realizado por Zoghbi *et al.*, (2006) que detectou 7,3-14,5%, utilizando o mesmo método de extração. Silva *et al.*, (2014) detectaram 8,27 % de mustacona, empregando a hidrodestilação e 11%-21,19% utilizando extração com CO₂ pressurizado. As diferenças quali-quantitativas dos componentes do óleo essencial podem ser influenciadas por diversos fatores como temperatura, luminosidade, sazonalidade, estágio de desenvolvimento, horário de coleta, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, altitude, poluição atmosférica, nutrição, pós-colheita, indução por estímulos mecânicos e ataque por patógenos (ADAMS; SPARKMAN, 2007), o que pode justificar as diferenças encontradas nos diferentes estudos.

As plantas medicinais e seus metabólitos secundários, aliados ao conhecimento tradicional, contribuem para o desenvolvimento de novos fármacos. A busca por compostos bioativos aumentou a importância das plantas medicinais (KAMALA *et al.*, 2018). Kamala *et al.*, (2018) destacaram que os metabólitos secundários α -ciperona e β -selineno obtidos a partir de *C. rotundus* exibiram forte atividade antimalárica. Os compostos citados também foram encontrados na análise da composição química por Zoghbi *et al.*, (2006) e Zoghbi *et al.*, (2008) em produtos vegetais a partir de *C. articulatus* e no OECA, analisado neste trabalho, nas concentrações de 0,589 e 0,312 % respectivamente.

Vários compostos isolados de plantas possuem atividade antiprotozoária como as chalconas, alcalóides, afoquinonas, lignanas, neolignanas e terpenos. Óleos essenciais ou voláteis geralmente são obtidos por técnicas de extração de fragrâncias como hidrodestilação ou destilação de arraste de vapor d'água. São misturas altamente complexas de moléculas sensíveis a temperatura de baixo peso molecular, geralmente apresentando odor agradável e sabor, além de algumas propriedades biológicas, sendo utilizados nas indústrias de cosméticos, de alimentos e farmacêuticas (RUBIOLO *et al.*, 2010; Calo *et al.*, 2015).

No presente estudo, quase 80 % da amostra estudada pertence à classe dos terpenóides. Os monoterpenos e sesquiterpenos foram os principais compostos metabólicos secundários identificados nos óleos essenciais de *C. articulatus* deste estudo, bem como no trabalho Zoghbi *et al.*, (2006). A artemisinina, importante antimalárico encontrado na *Artemisia annua* (Asteraceae), é um metabolito natural que representa a classe dos terpenóides com atividade biológica. A série terpênica é formada pela justaposição sucessiva de cinco carbonos (C5), denominados isopentenilpirofosfato (IPP). Nela encontram-se os monoterpenos com esqueleto carbônico formado por 10 átomos e os sesquiterpenos com 15 átomos de carbono, apresentando-se em vários arranjos em estruturas acíclicas, monocíclicas, dicíclicas e tetracíclicas. (RUBIOLO *et al.*, 2010; CALO *et al.*, 2015).

Os sesquiterpenos oxigenados representaram um total de 50,6 % do OECA, estando de acordo com os resultados apresentados por Silva *et al.*, (2014), que encontrou de 39-70% de sesquiterpenos oxigenados nas amostras de *C. articulatus*, aplicando hidrodestilação e CO₂ pressurizado como método de extração.

Dentre os estudos químicos acerca de *C. articulatus*, Nyasse *et al.*, (1988) relataram os principais componentes químicos do extrato hexânico dos rizomas, entre eles mandassidiona, mustacona e isopatchoul-4(5)en-3-ona, todos dicetonas sesquiterpênicas. Esses compostos também foram detectados por Zoghbi *et al.*, (2006) no óleo essencial dos rizomas, além do óxido de cariofileno (10,1%) e α -pineno (6,5%).

Para determinar a toxicidade do OECA, foram realizados testes de citotoxicidade e toxicidade aguda que apresentam fundamental importância quando se busca avaliar a atividade biológica de produtos de origem vegetal, visto que substâncias candidatas a novas drogas podem promover efeitos colaterais (SONAGLIO *et al.*, 2003). Nossos resultados demonstraram que a dose tóxica aguda do OECA é maior que 2000 mg/kg em camundongos BALB/c, classificando-a na categoria 5 do *Globally Harmonized Classification System* (GHS), segundo o critério do protocolo adotado.

Foi observada a variação de peso positiva dos camundongos tratados com o OECA e o controle (Tabela 3) no teste de toxicidade aguda com uma única dose. Não houve diferença estatística neste parâmetro, o que contribuiu para a classificação como altamente segura segundo a OECD, (2011). A toxicidade aguda de drogas testes podem ser observadas através de alterações na pele, nos pelos, nos olhos, nas mucosas, no peso, na atividade somatomotora ou no comportamento. A alteração imediata visível mais comum de ação tóxica é a redução do peso do animal (LEMOS *et al.*, 2018)

Singh *et al.*, (2015) relataram que o extrato etanólico de *Cyperus rotundus*, quando administrado por via oral em camundongos, nas concentrações de 5, 50, 300 e 2000 mg/Kg de peso corporal utilizando as diretrizes do protocolo 423 da OECD, não apresentou toxicidade aguda e nem mortalidade em nenhum grupo testado. Nosso resultado corrobora com o estudo descrito por esses autores quanto a toxicidade aguda do gênero *Cyperus*. Em um estudo semelhante de toxicidade aguda com óleo essencial de *C. articulatus*, na dose de 2000 mg/kg por via oral realizado por Metuge *et al.* (2014), também não causou morte em camundongos BALB/c.

Na análise do peso corporal dos animais, a variação de peso positiva ratifica a classificação da categoria 5 da GHS do OECA, como altamente segura. O resultado encontrado no teste de toxicidade aguda *in vivo* serviu como base para definir as doses do OECA a serem utilizados no teste antimalárico *in vivo* como recomendado por Balla *et al.*, (2018).

A avaliação do efeito citotóxico do OECA foi realizada pelo método da redução do MTT na linhagem celular Wi26VA-4, apresentando um $IC_{50} > 100$. Quando comparado com o IC_{50} das duas cepas de *P. falciparum*, nota-se uma margem de segurança, no mínimo, 40 vezes menor. O valor elencado do IC_{50} para a linhagem de células humanas demonstra a baixa ação citotóxica do OECA (Tabela 4).

No entanto, o óleo essencial de *C. articulatus* testado por Metuge *et al.*, (2014) foi considerado moderadamente tóxico em células de rins de macacos com o IC_{50} de 93,7 μ g/ml. O resultado diverge do apresentado pelas células do tipo Wi26VA-4 podendo estar relacionado

a variação da composição química do óleo. Não se têm descrito na literatura testes de citotoxicidade com outras linhagens celulares normais com a espécie *C. articulatus*.

Em um estudo realizado por Kabbashi *et al.*,(2015), utilizando extrato etanólico *Cyperus rotundus* L, do mesmo gênero da planta em estudo, em linhagens de rins de macacos, não foi apresentada citotoxicidade ($IC_{50} > 100$), semelhante ao resultado apresentado neste estudo.

No ensaio antiplasmódico *in vitro*, o OECA apresentou altopotencial antiparasitário com valores de IC_{50} 1,21 e 2,3 $\mu\text{g ml}^{-1}$ frente às duas cepas de *P. falciparum* 3D7 e a W2. Rukunga *et al.*,(2009)destacou que o extrato aquoso e etanólico dos rizomas de *C. articulatus*, através da técnica *in vitro* e micro diluição semiautomática, que mede a capacidade dos compostos em inibir a incorporação de [G-3H] hipoxantina no parasito, apresentou atividade inibitória do crescimento frente às cepas NF 54 (sensível a CQ) e ENT 36 (isolado CQ-resistente, originalmente obtido de um paciente de Entosopia, Província Rift-Valley, Quênia) com IC_{50} de 7,87 e 8,59 $\mu\text{g/ml}$ para o extrato aquoso e IC_{50} de 4,84 e 8,68 $\mu\text{g/ml}$ para o extrato etanólico, respectivamente. Comparando com nosso resultado, observamos que o OECA é mais ativo que os resultados do extrato aquoso e etanólico de *C. articulatus* descrito no trabalho de Rukunga *et al.*, (2009).

Rukunga *et al.*,(2008) descreveram a atividade antiplasmódica de dois sesquiterpenos isolados do extrato clorofórmico dos rizomas de *C. articulatus*, a corimbolona e mustacona, frente a cepas NF 54 e ENT 36 apresentando IC_{50} de 1,07 e 1,92 $\mu\text{g/ml}$ para e 0.14 e 0.25 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. Nota-se que o sesquiterpeno mustacona é 10 vezes mais ativo em relação a corimbolona. A mustacona é o composto majoritário encontrado no OECA cultivado em Santarém-PA, na concentração de 9,91%.

Outras espécies do gênero *Cyperus* são utilizadas mundialmente para o tratamento da malária, como a *C. rotundus* L. na medicina tradicional iraniana (GHAFARI *et al.*, 2013). Thebtaranonth *et al.*,(1995) descreveram a atividade antimalárica de sesquiterpenos presentes em tubérculos de *C. rotundus*, entre eles o patchoulenone, α -óxido de cariofileno, 10,12-peroxicalameneno e 4,7-dimetil-1-tetralona. O extrato acetato de etila do tubérculo de *C. rotundus* apresentou atividade antimalárica em ensaio baseado em fluorescência com IC_{50} de até 10 $\mu\text{g/ml}$, indicando ser eficaz contra as cepas 3D7 (cloroquina sensível) e INDO (resistente à cloroquina) de *P. falciparum* em um ensaio *in vitro* realizado por Kaushik *et al.*,(2013).

No desenvolvimento de novas drogas antimaláricas, buscam-se substâncias com alto índice de seletividade (IS), indicando sua especificidade pelas hemácias infectadas (BASORE *et al.*, 2015). De acordo com Katsuno *et al.*,(2015), uma droga com potencial antimalárico deve apresentar IS superior a 10. Considerando este parâmetro, o OECA exibiu excelente IS, com valor superior a 80 para a cepa *P. falciparum* W2 e 40 para a cepa *P. falciparum* 3D7.

A atividade antimalárica *in vivo* do OECA foi testado utilizando camundongos BALB/c infectados com o *P. berghei*. O OECA foi ativo na redução dos níveis de parasitemia na malária experimental seguindo a classificação adotada por Coutinho *et al.*,(2013)e De Rezende *et al.*,(2013), que consideraram ativas substâncias que provocam supressão parasitária > 40% em estudos de atividade antimalárica *in vivo*. O OECA provocou a supressão da parasitemia em 48,94% na concentração de 10mg/kg e supressão de parasitemia >74% para as doses de 100 e 200 mg/kg *in vivo*, enquadrando-se na classificação como droga ativa. No décimo dia, encontramos a parasitemia de 6,3%,3,31% e 3,06% correspondendo as doses de 10, 100, e 200 mg/Kg, respectivamente. Notou-se a redução da parasitemia sanguínea em todos os grupos tratados quando comparados ao grupo que foi somente infectado com o *P. berguei*, demonstrando resultados promissores que podemos associar posteriormente aos resultados dos indicadores sanguíneos, que possui efeito direto desta ação. Os dados da redução da parasitemia são semelhantes aos dados descritos na literatura em mesmo modelo experimental em testes com fitoterápico com efeito antimaláricos (BALLAL *et al.*, 2011).

Samy e Kadarkari(2011) também avaliaram a atividade antiplasmódica *in vivo* de outra espécie do gênero *Cyperus*, extratos das folhas de *Cyperus rotundus* em combinação com cloroquina frente ao *P. berghei* tolerante a cloroquina (estirpe NK65). Na dose de 500 mg/kg administrada em camundongos, os extratos ciclo-hexano (CH); cloreto de metileno (MC); extrato bruto (CE) e extrato metanólico (ME) apresentaram, respectivamente, 85±3.5%, 80±3.2%, 84±3.5% e 87±3.8% de inibição da parasitemia. A taxa de sobrevivência foi de 58%, 55%, 59% e 50% para os animais tratados com CH, MC, CE e ME, respectivamente. Em associação com cloroquina, as porcentagens de inibição da parasitemia foram de 87±3.1, 83±3.5, 87±3.0 e 90±4 e a taxa de sobrevivência de 60%, 58%, 61% e 63%, respectivamente.

Nossos dados demonstram que todos os animais que receberam tratamento com OECA obtiveram um tempo de sobrevida maior que 30 dias semelhante ao do Grupo 3, tratado com o antimalárico padrão, nas três doses testadas. Os animais infectados com *P. berghei* e não tratados permaneceram vivos somente até, o 12º dia após a infecção. O tempo de sobrevida demonstrado pelo Grupo 2, infectado por *P. berghei* e não tratada, corrobora com outros

trabalhos apresentado na literatura como média de sobrevida semelhantes, como apresentada por Somsak *et al.* 2015.

Os resultados da análise de sobrevivência demonstrados pelos Grupos 4, 5 e 6 tratados com o OECA nas doses de 200, 100 e 10 mg/kg/dia indicam, que a espécie estudada possui uma maior atividade antimalárica *in vivo*, quando/ comparamos com extratos das folhas de *Cyperus rotundus*, estudada por Samy e Kadarkari (2011), mesmo tendo utilizado uma dose 250% maior do que a dose testada neste trabalho, obteve menor tempo de sobrevivência nos camundongos infectados e tratados.

Não foi encontrado, na literatura, a descrição da atividade antimalárica *in vivo* de qualquer produto vegetal derivado da espécie *Cyperus articulatus* avaliando a parasitemia, a análise da sobrevida ou os parâmetros hematológicos em camundongos ou ratos. A anemia, trombocitopenia e leucocitose são alguns dos principais sintomas nas infecções por malária, levando a complicações hematológicas importante comuns em pacientes com malária. Ao se desenvolver de formas sexuadas no interior dos glóbulos vermelhos o *Plasmodium* provoca a lise das hemácias consequentemente a redução de hemoglobina e o volume das células, além de as alterações estruturais, bioquímicas e fisiológicas resultando em anemia grave o que pode comprometer todos os órgãos e tecidos do corpo humano (ASANGA *et al.*, 2017).

A redução do RBC, HTC e HGB nos camundongos infectados com o *P. berghei* não tratados descritos na tabela 4, são semelhantes aos encontrados por Ballal *et al.*, (2011) e Souza *et al.*, (2018) indicando concordância com o apresentado pela literatura que utilizaram modelos de infecções em camundongos.

O Grupo 3, do nosso experimento, tratado com artemisinina que é um fármaco padrão utilizado no tratamento da malária obteve diferença significativa ($p < 0,001$) do grupo malária, com o aumento dos valores de RBC, HTC e HGB. A reversão desses parâmetros no grupo artemisinina evidenciou a eficácia em reproduzir a relação parasito-hospedeiro no modelo experimental com camundongos BALB/c, o que se torna importante quando se objetiva analisar o efeito produzido pela droga teste nestes parâmetros (MIZOBUCHI *et al.*, 2014).

Os resultados dos parâmetros hematológicos da série vermelha (tabela 5) demonstrou que houve um aumento no número de eritrócitos de 144,85%, 120,08% e 9,67%, de quantidade de hemoglobina de 94,15%, 90,58% e 12,66% e no percentual do hematócrito de 105,54%, 82,12% e 21,12% dos grupos tratados com o óleo essencial de *C. articulatus* nas doses de 200 mg, 100mg e 10 mg, respectivamente em relação ao grupo malária não tratada. O tratamento com a Artemisinina 100 mg (Grupo 3) promoveu o aumento de 205,53%, 121,01% e 129,73%

no número de hemácias, quantidade de hemoglobina e percentual de hematócrito, respectivamente.

A anemia representa o curso severo da malária e está complicação clínica que pode ser letal, também pode ser observada na infecção de camundongos com o *P. berghei*. Os resultados encontrados no exame de sangue mostraram que o tratamento com OECA nas doses de 100 e 200 mg/kg apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) no aumento do RBC, HTC e HGB em relação ao grupo malária (tabela 5). O RBC, HTC e HGB foram superiores a $8 \times 10^6 \mu/l$, 13 g/dl e 43 % nos grupos tratados com OECA nas doses de 100 e 200 mg/kg, enquanto que o grupo não tratado apresentaram os valores de $3,6 \times 10^6 \mu/l$, 6,94 g/dl e 25,34%, respectivamente, que são correspondentes ao quadro de anemia. Os resultados mostram a eficácia do tratamento com OECA no aumento dos principais parâmetros hematológicos. A diminuição da hemólise provocada pela redução da parasitemia nos grupos testados com o OECA está fortemente associado com o aumento significativo do RBC, HTC e HGB revertendo o quadro anêmico frequente na malária.

O resultado do parâmetro hematológico (Leucograma) (Tabela 6) demonstrou que houve uma redução no número de leucócitos de 93,34%, 91,48% e 89,32% dos grupos tratados com o óleo essencial de *C. articulatus* nas doses de 200 mg, 100mg e 10 mg, respectivamente em relação ao grupo Grupo 2. O tratamento com a Artemisinina 100 mg (Grupo 3) promoveu a redução de 94,88%. Os números de leucócitos estão aumentado em um em um estágio de infecção, o que pode ser visualizado no grupo 2.

O aumento no WBC após a infecção pelo plasmódio no Grupo 2 indica a tentativa do sistema imunológico de combater a infecção, de acordo com o apontado por Lacerda-Queiroz *et al.*, (2012) na resposta inflamatória de camundongos BALB/C infectados por *P. berghei*.

Avaliando o leucograma dos animais (tabela 6) com apoio da literatura (Ballal *et al.*, 2011; Lacerda-Queiroz *et al.*, 2012), podemos inferir que a redução significativa ($P < 0,001$) no número de leucócitos totais incluindo os linfócito, monócitos e neutrófilos segmentados nos animais infectados com *Plasmodium* tratados com OECA nas doses de 100 e 200 mg/kg/ por peso corporal quando comparados ao grupo malária, pode estar relacionado a redução da parasitemia (<74% para ambos os grupos) nestes grupos, o que gerou a redução da resposta inflamatória dos animais, relacionado a diminuição da hemólise excessiva, que gera a liberação do parasito e inicia a resposta imunológica celular com o recrutamento das células de defesa.

8 CONCLUSÃO

O OECA obtido a partir dos rizomas de *Cyperus articulatus* cultivados em Santarém (PA), que apresentou como principal composto o mustakone, exibiu baixo IC₅₀ contra duas cepas de *Plasmodium falciparum* - W2 e 3D7. Também demonstrou um efeito significativo na supressão da parasitemia de camundongos BALB/c infectados com *P. berghei*, além da redução da anemia, interrompendo a esquizogonia eritrocítica. Além disso, tem baixa citotoxicidade contra a cepa humana Wi26VA-4 e toxicidade aguda *in vivo* superior a doses de 2.000 mg/kg. Em comparação com a artemisinina, a OECA exibiu resultados promissores,

levando em conta que os óleos voláteis são uma mistura complexa para vários compostos que podem agir sinergicamente. *Cyperus articulatus* que hoje é principalmente explorado como matéria-prima pela indústria cosmética possui potencial antimalárico e merece estudos posteriores que possam levar ao desenvolvimento de uma droga alternativa no tratamento da malária.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHAN, J. et al. Quinine, an old anti-malarial drug in a modern world: role in the treatment of malaria. **Malaria journal**, v. 10, n. 1, p. 144, 2011. ISSN 1475-2875.

ADAMS, R. P.; SPARKMAN, O. D. Review of Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. **J Am Soc Mass Spectrom**, v. 18, p. 803-806, 2007.

AKENDENGUE, B. Medicinal plants used by the Fang traditional healers in Equatorial Guinea. **Journal of ethnopharmacology**, v. 37, n. 2, p. 165-173, 1992. ISSN 0378-8741.

ALVES, M. et al. Diversity of Cyperaceae in Brazil. **Rodriguésia**, p. 771-782, 2009. ISSN 0370-6583.

ANDRADE-NETO, V. F. et al. Antimalarial activity of *Bidens pilosa* L.(Asteraceae) ethanol extracts from wild plants collected in various localities or plants cultivated in humus soil. **Phytotherapy Research**, v. 18, n. 8, p. 634-639, 2004. ISSN 1099-1573.

ARIEY, F. et al. A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. **Nature**, v. 505, n. 7481, p. 50-55, 2014. ISSN 0028-0836.

ASANGA, E. et al. Hematological indices of *Plasmodium berghei* infected mice treated with ethanol extract and fractions of *Nauclea latifolia* roots. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 6, n.12, p. 2546-2556, 2017.

AZZAZ, N. A.; EL-KHATEEB, A. Y.; FARAG, A. A. Chemical composition and biological activity of the essential oil of *Cyperus articulatus*. **International Journal of Academic Research**, v. 6, n. 5, p. 265-269, 2014. ISSN 2075-4124.

BALLAL, A. et al. Anti-malarial effect of gum arabic. **Malaria journal**, v. 10, n. BioMed Central, p. 139, 2011.

BIOT, C. et al. The therapeutic potential of metal-based antimalarial agents: implications for the mechanism of action. **Dalton Transactions**, v. 41, n. 21, p. 6335-6349, 2012.

BRASIL. **RENISUS –Relação de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS**. Brasília: Ministério da Saúde 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Lista de municípios pertencentes às áreas de risco ou endêmicas para malária**. Brasília, 2018.

BUFFET, P. A. et al. The pathogenesis of *Plasmodium falciparum* malaria in humans: insights from splenic physiology. **Blood**, v. 117, n. 2, p. 381-392, 2011. ISSN 0006-4971.

BUM, E. N. et al. Extracts from rhizomes of *Cyperus articulatus* (Cyperaceae) displace [3H] CGP39653 and [3H] glycine binding from cortical membranes and selectively inhibit NMDA receptor-mediated neurotransmission. **Journal of ethnopharmacology**, v. 54, n. 2-3, p. 103-111, 1996. ISSN 0378-8741.

BUM, E. N. et al. Effects of *Cyperus articulatus* compared to effects of anticonvulsant compounds on the cortical wedge. **Journal of ethnopharmacology**, v. 87, n. 1, p. 27-34, 2003. ISSN 0378-8741.

BUM, E. N. et al. Anticonvulsant properties of the methanolic extract of *Cyperus articulatus* (Cyperaceae). **Journal of ethnopharmacology**, v. 76, n. 2, p. 145-150, 2001. ISSN 0378-8741.

BUSSMANN, R. W.; GLENN, A. Cooling the heat-Traditional remedies for malaria and fever in Northern Peru. **Ethnobotany research and applications**, v. 8, p. 125-134, 2010. ISSN 1547-3465.

CALO, J. R. et al. Essential oils as antimicrobials in food systems—A review. **Food Control**, v. 54, p. 111-119, 2015. ISSN 0956-7135.

CAMARGO, E. P. A malária encenada no grande teatro social. **Estudos Avançados**, v. 9, n. 24, p. 211-228, 1995. ISSN 0103-4014.

CARVALHO, L. et al. Antimalarial activity of crude extracts from Brazilian plants studied in vivo in *Plasmodium berghei*-infected mice and in vitro against *Plasmodium falciparum* in culture. **Brazilian journal of medical and biological research= Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas/Sociedade Brasileira de Biofisica...[et al.]**, v. 24, n. 11, p. 1113-1123, 1990. ISSN 0100-879X.

CDC. Parasites and Health-Malaria. **Department of Health and Human Services**, 2016. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/>>. Acesso em: 13 de Março de 2017.

COUTINHO, J. P. et al. *Aspidosperma* (Apocynaceae) plant cytotoxicity and activity towards malaria parasites. Part I: *Aspidosperma nitidum* (Benth) used as a remedy to treat fever and malaria in the Amazon. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 8, p. 974-982, 2013. ISSN 0074-0276.

CROMPTON, P. D. et al. Malaria immunity in man and mosquito: insights into unsolved mysteries of a deadly infectious disease. **Annual review of immunology**, v. 32, p. 157-187, 2014. ISSN 0732-0582.

CUI, L. et al. Antimalarial drug resistance: literature review and activities and findings of the ICEMR network. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, p. 15-0007, 2015. ISSN 0002-9637.

DA SILVA, I. C. M. et al. Extraction of essential oil from *Cyperus articulatus* L. var. *articulatus* (pripioca) with pressurized CO₂. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 88, p. 134-141, 2014. ISSN 0896-8446.

DAS, B. Renal failure in malaria. **Journal of vector borne diseases**, v. 45, n. 2, p. 83, 2008. ISSN 0972-9062.

DATTA, S. et al. Hepatoprotective activity of *Cyperus articulatus* Linn. against paracetamol induced hepatotoxicity in rats. **J Chem Pharm Res**, v. 5, n. 1, p. 314-319, 2013.

DAVIDSE, G. **Flora mesoamericana. 6. Alismataceae a Cyperaceae.** Univ. Nacional Autónoma de México, Inst. de Biología, 1994. ISBN 9683633102.

DE ALMEIDA, M. Z. **Plantas medicinais.** SciELO-EDUFBA, 2003. ISBN 8523212167.

DE REZENDE, L. C. D. et al. In vivo antimalarial activity of novel 2-hydroxy-3-anilino-1, 4-naphthoquinones obtained by epoxide ring-opening reaction. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 23, n. 16, p. 4583-4586, 2013. ISSN 0960-894X.

DESMARCHELIER, C. et al. Studies on the cytotoxicity, antimicrobial and DNA-binding activities of plants used by the Ese'ejas. **Journal of ethnopharmacology**, v. 50, n. 2, p. 91-96, 1996. ISSN 0378-8741.

DO NASCIMENTO MARTINEZ, L. et al. Avaliação Etnobotânica De Plantas Utilizadas Como Potenciais Antimaláricos Na Região Da Amazônia Ocidental Brasileira. **Interfaces Científicas-Saúde e Ambiente**, v. 6, n. 2, p. 9-20, 2018. ISSN 2316-3798.

DUARTE, M. C. T. et al. Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of ethnopharmacology**, v. 97, n. 2, p. 305-311, 2005. ISSN 0378-8741.

FAIRHURST, R. M.; DONDORP, A. M. Artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. **Microbiology spectrum**, v. 4, n. 3, 2016.

FRANÇA, Tanos CC; SANTOS, Marta G. dos; FIGUEROA-VILLAR, José D. **Malária: aspectos históricos e quimioterapia.** **Quim Nova**, v. 31, n. 5, p. 1271-1278, 2008.

FIRMO, W. D. C. A. et al. Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. **Cadernos de Pesquisa**, v. 18, 2012. ISSN 2178-2229.

FRASON, A. et al. Estratégias e desafios no combate à malária. **Rev Liberato (Novo Hamburgo)[Internet]**, v. 10, n. 14, p. 201-8, 2009.

GERALD, N.; MAHAJAN, B.; KUMAR, S. Mitosis in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Eukaryotic cell**, v. 10, n. 4, p. 474-482, 2011. ISSN 1535-9778.

GHAFFARI, S. et al. Plants used to treat “tabe rebá”(malaria like fever) in Iranian Traditional Medicine. **International Journal of Traditional and Herbal Medicine**, v. 1, n. 6, p. 168-176, 2013.

GIRMA, S. et al. Effect of crude leaf extract of *Osyris quadripartita* on *Plasmodium berghei* in Swiss albino mice. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 15, n. 1, p. 184, 2015. ISSN 1472-6882.

GOETGHEBEUR, P. Cyperaceae. In: (Ed.). **Flowering Plants· Monocotyledons**: Springer, 1998. p.141-190.

GOMES, A. P. et al. Severe *Plasmodium falciparum* malaria. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 23, n. 3, p. 358-369, 2011. ISSN 0103-507X.

GUIDELINE, O. 423: Acute oral toxicity-acute toxic class method. **OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. OECD. OECD Publishing, Paris, France**, p. 1-14, 2001.

HEINBERG, A.; KIRKMAN, L. The molecular basis of antifolate resistance in *Plasmodium falciparum*: looking beyond point mutations. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1342, n. 1, p. 10-18, 2015. ISSN 1749-6632.

HEMINGWAY, J. et al. Tools and strategies for malaria control and elimination: what do we need to achieve a grand convergence in malaria? **PLoS biology**, v. 14, n. Public Library of Science, p. e1002380, 2016.

JOSLING, G. A.; LLINÁS, M. Sexual development in *Plasmodium* parasites: knowing when it's time to commit. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 9, p. 573-587, 2015. ISSN 1740-1526.

KABBASHI, A. S. et al. Antimicrobial activity and cytotoxicity of ethanolic extract of *Cyperus rotundus* L. **Am J Pharmacy Pharmaceut Sci**, v. 2, n. 1, p. 1-13, 2015.

KAMALA, A.; MIDDHA, S. K.; KARIGAR, C. S. Plants in traditional medicine with special reference to *Cyperus rotundus* L.: a review. **3 Biotech**, v. 8, n. 7, p. 309, 2018. ISSN 2190-572X.

KATSUNO, K. et al. Hit and lead criteria in drug discovery for infectious diseases of the developing world. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, n. 11, p. 751-758, 2015. ISSN 1474-1776.

KAUSHIK, N. K. et al. Antiplasmodial potential of selected medicinal plants from eastern Ghats of South India. **Experimental parasitology**, v. 134, n. 1, p. 26-32, 2013. ISSN 0014-4894.

LACERDA-QUEIROZ, N. et al. Platelet-activating factor receptor is essential for the development of experimental cerebral malaria. **The American journal of pathology**, v. 180, n. 1, p. 246-255, 2012. ISSN 0002-9440.

LAMBROS, C.; VANDERBERG, J. P. Synchronization of Plasmodium falciparum erythrocytic stages in culture. **The Journal of parasitology**, p. 418-420, 1979. ISSN 0022-3395.

LEITE, F. H. A. et al. Malária: dos velhos fármacos aos novos alvos moleculares. **BBR-Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 2, n. 4, p. 59-76, 2014. ISSN 2316-5200.

LEMONS, D. C. S. et al. Toxicidade aguda em camundongos BALB/c expostos a efluentes de curtume. **Multi-Science Journal**, v. 1, p. 2359-6902, 2018.

MELO, C. R. et al. O uso de plantas medicinais para doenças parasitárias. **Acta Brasiliensis**, v. 1, n. 1, p. 28-32, 2017. ISSN 2526-4338.

METUGE, J. A. et al. Anti-Onchocerca activity and phytochemical analysis of an essential oil from Cyperus articulatus L. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 14, n. 1, p. 223, 2014. ISSN 1472-6882.

MIZOBUCHI, H. et al. The accumulation of macrophages expressing myeloid-related protein 8 (MRP8) and MRP14 in the spleen of BALB/cA mice during infection with Plasmodium berghei. **Experimental parasitology**, v. 138, p. 1-8, 2014. ISSN 0014-4894.

MONGELLI, E. et al. Antimicrobial activity and interaction with DNA of medicinal plants from the Peruvian Amazon region. **Revista Argentina de microbiologia**, v. 27, n. 4, p. 199-203, 1994. ISSN 0325-7541.

MOREIRA, P. O. L. et al. Síntese e avaliação da atividade citotóxica in vitro de análogos de alcalóides 3-alquilpiridínicos contendo o grupo tiossemicarbazona. **Revista Científica da Faculdade de Medicina de Campos**, v. 10, p. 17-21, 2015.

MOURA, L. S. et al. Phase equilibrium measurements for CO₂+ priprioica extract at high pressures. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 48, n. 2, p. 126-130, 2009. ISSN 0896-8446.

MUNIZ, T. F. et al. AVALIAÇÃO DE MARCADORES DE ATIVAÇÃO E REGULAÇÃO EM LEUCÓCITOS DE PACIENTES INFECTADOS. **Revista de Ciências da Saúde**, p. 22-31, 2017.

NEVES, D.; MELO, A.; LINARDI, P. E Vitor, **RWA Parasitologia humana**: São Paulo: Ateneu 2011.

NYASSE, B. et al. Mandassidione and other sesquiterpenic ketones from *Cyperus articulatus*. **Phytochemistry**, v. 27, n. 10, p. 3319-3321, 1988. ISSN 0031-9422.

OLADOSU, I. et al. Antibacterial activity of rhizomes essential oils of two types of *Cyperus articulatus* growing in Nigeria. **Adv Biol Res**, v. 5, n. 3, p. 179-183, 2011.

OLIVEIRA, M. D. U. et al. Antimalarial ethnopharmacology in the Brazilian Amazon. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 35, n. 4, 2014. ISSN 1808-4532.

OLIVEIRA, M. D. U. D. et al. Antimalarial ethnopharmacology in the Brazilian Amazon. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 35, n. 4, 2014. ISSN 1808-4532.

O'NEILL, P. M.; BARTON, V. E.; WARD, S. A. The molecular mechanism of action of artemisinin—the debate continues. **Molecules**, v. 15, n. 3, p. 1705-1721, 2010.

PETERS, W. The problem of drug resistance in malaria. **Parasitology**, v. 90, n. 04, p. 705-715, 1985. ISSN 1469-8161.

POHLIT, A. et al. Amazonian plant natural products: perspectives for discovery of new antimalarial drug leads. **Molecules**, v. 18, n. 8, p. 9219-9240, 2013.

RAKOTONIRINA, V. S. et al. Sedative properties of the decoction of the rhizome of *Cyperus articulatus*. **Fitoterapia**, v. 72, n. 1, p. 22-29, 2001. ISSN 0367-326X.

ROSENTHAL, P. J. Antimalarial drug discovery: old and new approaches. **Journal of Experimental Biology**, v. 206, n. 21, p. 3735-3744, 2003. ISSN 0022-0949.

RUBIOLO, P. et al. Essential oils and volatiles: sample preparation and analysis. A review. **Flavour and fragrance journal**, v. 25, n. 5, p. 282-290, 2010. ISSN 0882-5734.

RUKUNGA, G. et al. Anti-plasmodial activity of the extracts of some Kenyan medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 121, n. 2, p. 282-285, 2009. ISSN 0378-8741.

RUKUNGA, G. et al. Anti-plasmodial activity of the extracts and two sesquiterpenes from *Cyperus articulatus*. **Fitoterapia**, v. 79, n. 3, p. 188-190, 2008. ISSN 0367-326X.

SAMY, K.; KADARKARI, M. Antimalarial activity of traditionally used Western Ghats plants from India and their interactions with chloroquine against chloroquine-tolerant *Plasmodium*

berghei. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 11, n. 3, p. 259-268, 2011. ISSN 1530-3667.

SHI, C. et al. Anti-inflammatory and immunoregulatory functions of artemisinin and its derivatives. **Mediators of inflammation**, v. 2015, 2015. ISSN 0962-9351.

SINGH, B.; DANESHVAR, C. Human infections and detection of *Plasmodium knowlesi*. **Clinical microbiology reviews**, v. 26, n. 2, p. 165-184, 2013. ISSN 0893-8512.

SOMSAK, V. et al. Effect of Aqueous Crude Extract of *Tinospora Crispa* on *Plasmodium Berghei* Induced Liver Damage in Mice. **Malaria Control & Elimination**, v. 4, p. 127, 2015.

SONAGLIO, D. et al. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. **SIMÕES, CMO; SCHENKEL, EP; GOSMANN, G.; MELLO, JCP**, p. 289-326, 2003.

SOUZA, B. T. T. Contribuição dos modelos murinos na malária experimental. 2018.

STERLY, J.; BOUQUET, A. **Féticheurs et médecines traditionnelles du Congo**: JSTOR 1971.

TANGPUKDEE, N. et al. Malaria diagnosis: a brief review. **The Korean journal of parasitology**, v. 47, n. Korean Society for Parasitology, p. 93, 2009.

THEBTARANONTH, C. et al. Antimalarial sesquiterpenes from tubers of *Cyperus rotundus*: structure of 10, 12-peroxycalamenene, a sesquiterpene endoperoxide. **Phytochemistry**, v. 40, n. 1, p. 125-128, 1995. ISSN 0031-9422.

TRAGER, W.; JENSEN, J. B. Human malaria parasites in continuous culture. **Science**, v. 193, n. 4254, p. 673-675, 1976. ISSN 0036-8075.

WHITE, N. J. Malaria: a molecular marker of artemisinin resistance. **The Lancet**, v. 383, n. 9927, p. 1439-1440, 2014. ISSN 0140-6736.

WICKRAMASINGHE, S.; ABDALLA, S. Blood and bone marrow changes in malaria. **Best Practice & Research Clinical Haematology**, v. 13, n. 2, p. 277-299, 2000. ISSN 1521-6926.

ZOGHBI, M. et al. Química das espécies de *Cyperus* conhecidas como *priprioca*. **Priprioca: um recurso aromático do Pará**, p. 53-76, 2008.

ZOGHBI, M. D. G. et al. Comparison of the Main Components of the Essential Oils of “priprioca”: *Cyperus articulatus* var. *articulatus* L., *C. articulatus* var. *nodosus* L., *C. prolixus* Kunth and *C. rotundus* L. **Journal of Essential Oil Research**, v. 20, n. 1, p. 42-45, 2008. ISSN 1041-2905.

ZOGHBI, M. D. G. B. et al. Yield and chemical composition of the essential oil of the stems and rhizomes of *Cyperus articulatus* L. cultivated in the state of Para, Brazil. **Journal of Essential Oil Research**, v. 18, n. 1, p. 10-12, 2006. ISSN 1041-2905.