



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO TECNOLÓGICA.
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

CAMILA CASTILHO MORAES

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMALÁRICA *IN VIVO* DO EXTRATO
ACETÔNICO DO RESÍDUO INDUSTRIAL DE ANDIROBA (*Carapa guianensis*)**

**SANTARÉM-PA
2022**

CAMILA CASTILHO MORAES

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMALÁRICA *IN VIVO* DO EXTRATO
ACETÔNICO DO RESÍDUO INDUSTRIAL DE ANDIROBA (*Carapa guianensis*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Oeste
do Pará - UFOPA, para a obtenção do título de Mestra
em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Waldiney Pires Moraes

**SANTARÉM-PA
2022**

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

M828a Moraes, Camila Castilho

Avaliação da atividade antimalárica *in vivo* do extrato acetônico do resíduo industrial de andiroba (*Carapa guianensis*) / Camila Castilho Moraes – Santarém, 2023.

59 f.: il.

Orientador: Waldiney Pires Moraes

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Oeste do Pará, Pró-reitoria de Pesquisa, Pós-graduação e inovação tecnológica, Instituto de Saúde Coletiva, Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde.

1. Malária. 2. *Carapa guianensis*. 3. *Plasmodium*. 4. Atividade antimalárica. I. Moraes, Waldiney Pires, orient. II. Título.

CDD: 23 ed. 639.2098115

Bibliotecária - documentalista: Mary Caroline Santos Ribeiro – CRB-2/566



Universidade Federal do Oeste do Pará

PROGRAMA DE MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ATA Nº 6

Aos vinte e três dias do mês de setembro de dois mil e vinte e dois, às 16h00min, no miniauditório do ICS, situado no BMT 1 na Unidade Tapajós, conforme orientação da CAPES - Portaria Nº36 de 19 de março de 2020, instalou-se a banca examinadora de dissertação de mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da discente CAMILA CASTILHO MORAES. A banca examinadora foi composta pelos professores, Dr. Antonio Humberto Hamad Minervino, UFOPA e Dr. Lincoln Lima Oliveira, UFOPA, examinadores externos ao programa, Dr. Thalís Ferreira dos Santos, UFOPA, examinador interno e Dr. Waldiney Pires Moraes, UFOPA, orientador da dissertação. Seguindo o regimento interno do programa, deu-se início a abertura dos trabalhos por parte do orientador e presidente da banca que após apresentar os membros e esclarecer a tramitação da defesa, solicitou a discente que iniciasse a exposição da dissertação intitulada "Avaliação da atividade antimalárica in vivo do extrato acetônico do resíduo industrial de andiroba (*Carapa guianensis*)", marcando tempo variante de 40 a 50 minutos de apresentação. Concluída a exposição, o professor Dr. Waldiney Pires Moraes, presidente, passou a palavra aos examinadores externos Dr. Antonio Humberto Hamad Minervino e Dr. Lincoln Lima Oliveira para arguir a discente e em seguida ao Dr. Thalís Ferreira dos Santos, examinador interno para que fizesse o mesmo. Após as considerações sobre o trabalho em julgamento, sem a presença da mestranda, os referidos membros da banca deliberaram parecer favorável a defesa da dissertação tendo sido APROVADA a discente de acordo com as normas vigentes da Universidade Federal do Oeste do Pará. A versão final da dissertação deverá ser entregue ao programa no prazo de 30 dias a contar da data de defesa contendo as modificações sugeridas pela banca examinadora e constante na folha de correção anexa. Conforme o regimento e resoluções a discente não terá o título se não cumprir as exigências listadas. Nada mais havendo por constar, lavrou-se e fez-se a leitura da presente ata que segue assinada pelos membros da banca examinadora, presidente/orientador e mestranda.

Dr. LINCOLN LIMA CORREA, UFOPA

Examinador Externo ao Programa

Dr. ANTONIO HUMBERTO HAMAD MINERVINO, UFOPA

Examinador Externo ao Programa

Dr. THALIS FERREIRA DOS SANTOS, UFOPA

Examinador Interno

Dr. WALDINEY PIRES MORAES, UFOPA

Presidente

CAMILA CASTILHO MORAES

Mestrando

Deus é bom o tempo todo.

Aos meus pais, Francisco Pires Moraes Filho e Maria Iracilda Serrão Castilho, por todo amor,
carinho e incentivos constantes.

Aos meus familiares e amigos, pelo amor, apoio e compreensão durante toda essa jornada.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar presente em cada momento da minha vida, me fortalecendo me dando saúde, força e proteção.

À minha família, irmãos, parentes e amigos, pelo amor, apoio e incentivo durante este processo.

Ao meu orientador Dr. Waldiney Pires Moraes, a quem tenho profunda admiração por sua competência e paciência. Muito obrigada por todo apoio e conhecimento transmitido.

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

Aos meus colegas da primeira turma de Mestrado do PPGCSA (Turma 2019), por todo apoio, incentivo, conhecimento, confiança e companheirismo durante esses anos de muita dedicação.

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

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

A todos os integrantes do Biotério da Universidade do Estado do Pará.

A Empresa extratora de óleo vegetal AmazonOil.

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

À UFOPA, CNPq, CAPES e FAPESPA pelo apoio e incentivo à pesquisa científica.

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

“Admiro a arte da dúvida, ela por sua vez traz a busca pelo conhecimento, e este explora o novo, quebra paradigmas e traz a convicção plena” Rafaela Resende

RESUMO

A malária é uma doença infecciosa, negligenciada, endêmica em mais de 85 países, responsável por mais de 241 milhões de casos, considerada um dos maiores problemas econômicos e sociais do mundo. No Brasil, em 2020 foram notificados 145.188 casos da doença. O *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium vivax*, são os principais responsáveis pela maioria dos casos da doença. A erradicação da malária é de interesse global, no entanto, a falta de uma vacina, o aparecimento de parasitas resistentes e sua grande endemicidade dificultam esse controle, e justificam a busca por novas moléculas bioativas para a produção de novos fármacos com potencial antimalárico. Deste modo, esta pesquisa avaliou a atividade antimalárica *in vivo* do extrato acetônico de *Carapa guianensis*, assim como sua toxicidade aguda, análise de sobrevivência e análise dos parâmetros hematológicos. O resíduo industrial de *C. guianensis* foi fornecido pela empresa extratora de óleo vegetal AmazonOil localizada na cidade de Ananindeua-PA. A análise da composição química de *C. guianensis*, foi realizada por meio da Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas sequencial (EM-EM). A avaliação da toxicidade *in vivo* em camundongos BALB/c foi realizada conforme o Guia OECD. Para se avaliar a atividade antimalárica *in vivo* foram utilizados 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 identificou limonoides como composto majoritários sendo eles methyl angolensate (21,17%) e 6 α -acetoxygedunin (12,38%). A dose tóxica aguda do extrato acetônico de *C. guianensis* foi superior a 2000 mg/kg em camundongos BALB/c, sendo classificado na categoria 5 do Globally Harmonized Classification System (GHS). As doses do extrato acetônico (100 e 200 mg/kg/dia) reduziram significamente a parasitemia induzida pelo *P. berghei*, assim como, obtiveram um resultado importante na avaliação de sobrevida dos camundongos. Diante do exposto, o extrato acetônico de *C. guianensis*, um produto natural da Amazônia apresentou potencial antimalárico seguro e promissor candidato às novas pesquisas complementares necessárias ao desenvolvimento de novos fármacos.

Palavras-chave: Malaria, *Carapa guianensis*, *Plasmodium*, atividade antimalárica.

ABSTRACT

Malaria is an infectious disease, neglected, endemic in more than 85 countries, responsible for more than 241 million cases, considered one of the biggest economic and social problems in the world. In Brazil, in 2020, 145,188 cases of the disease were reported. *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* are primarily responsible for most cases of the disease. Malaria eradication is of global interest, however, the lack of a vaccine, the emergence of resistant parasites and their high endemicity make this control difficult, and justify the search for new bioactive molecules for the production of new drugs with antimalarial potential. Thus, this research evaluated the in vivo antimalarial activity of the acetone extract of *Carapa guianensis*, as well as its acute toxicity, survival analysis and analysis of hematological parameters. The industrial residue of *C. guianensis* was supplied by the vegetable oil extractor company AmazonOil located in the city of Ananindeua-PA. The analysis of the chemical composition of *C. guianensis* was performed by means of ultra-performance liquid chromatography coupled to sequential mass spectrometry (MS-MS). Assessment of in vivo toxicity in BALB/c mice was performed according to the OECD Guide. To evaluate the antimalarial activity in vivo, BALB/c mice were used, infected with approximately 10⁶ erythrocytes parasitized by *P. berghei* receiving treatment on the 4th day after inoculation, treated for 7 consecutive days and submitted to blood collection to determine the hematological parameters. The chemical characterization identified limonoids as the major compounds being methyl angolensate (21.17%) and 6 α -acetoxygedunin (12.38%). The acute toxic dose of acetone extract of *C. guianensis* was higher than 2000 mg/kg in BALB/c mice, being classified in category 5 of the Globally Harmonized Classification System (GHS). The doses of acetone extract (100 and 200 mg/kg/day) significantly reduced *P. berghei* induced parasitaemia, as well as obtaining an important result in the evaluation of mouse survival. In view of the above, the acetone extract of *C. guianensis*, a natural product from the Amazon, presented a safe antimalarial potential and a promising candidate for further complementary research. Necessary for the development of new drugs.

Keywords: Malaria, *Carapa guianensis*, *Plasmodium*, antimalarial activity

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Distribuição mundial da malária	14
Figura 2 – Mosquito <i>Anopheles darlingi</i>	16
Figura 3 – Ciclo de vida do <i>Plasmodium</i>	18
Figura 4 – <i>Carapa guianensis</i>	27
Figura 5 – Extração do extrato acetônico do resíduo industrial <i>C. guianensis</i>	32
Figura 6 – Protocolo de Toxicidade de Classe – Esquema de doses OECD – 423/2001	34
Figura 7 – Análise da capacidade hemolítica do extrato acetônico de <i>C. guianensis</i>	40
Figura 8 – Evolução da parasitemia dos camundongos BALB/c infectados com <i>Plasmodium berghei</i>	41
Figura 9 – Tempo de sobrevivência dos camundongos BALB/s infectados com o <i>Plasmodium berghei</i>	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Relação das propriedades medicinais de <i>Carapa guianensis</i>	28
Tabela 2 – Média de extrações do extrato acetônico de <i>Carapa guianensis</i>	38
Tabela 3 – Teste para a confirmação da dose máxima de segurança biológica oral do extrato acetônico de <i>Carapa guianensis</i>	39
Tabela 4 – Repetição do teste para a confirmação da dose máxima de segurança do extrato acetônico de <i>Carapa guianensis</i>	39
Tabela 5 – Análise hematológica dos grupos experimentais tratados com extrato acetônico de <i>Carapa guianensis</i> e artemisinina no 11º dia após a infecção por <i>Plasmodium berghei</i> em camundongos BALB/c	43
Tabela 6 – Análise dos parâmetros hematológica da série branca (leucócitos) dos grupos experimentais tratados com extrato acetônico de <i>Carapa guianensis</i> e artemisinina no 11º dia após a infecção por <i>Plasmodium berghei</i> em camundongos BALB/c	44

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

WHO/OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
HIV	Vírus da Imunodeficiência humana
IRA	Insuficiência renal aguda
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
TDR	Testes de diagnóstico rápido
DNA	cido Desoxirribonucleico
DHPS	Inibidores da dihidropteroato sintase
DHFR	Inibidores da dihidrofolato redutase
UFOPA	Universidade Federal do Oeste do Pará
LC	Cromatografia líquida
MS	Espectrmetro de massa
CEUA	Comitê de tica no Uso Animal
UNICAMP	Universidade Federal de Campinas
OECD	Guia de Toxicidade Aguda de Classes
PBS	Solução Tampão Fosfato Salino
EDTA	cido etilenodiamino tetra-acético
DMSO	Dimetilsulfóxido
HCM	Concentração da Hemoglobina Média
CHCM	Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média
DL50	Dose letal mediana
PB	<i>Plasmodium berghei</i>
RBC	Contagem total de eritrócitos
HGB	Contagem total de hemoglobina
HCT	Contagem total de eritrócito
WBC	Contagem total de leucócitos

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1 Características da malária	15
2.2 Transmissão e ciclo biológico do <i>Plasmodium</i>	16
2.3 Patogenia da malária	18
2.4 Diagnóstico	20
2.4.1 Diagnóstico clínico.....	21
2.4.2 Diagnóstico laboratorial.....	21
2.5 Vacina	22
2.6 Fármacos antimaláricos	23
2.6.1 Artemisinina e seus derivados.....	24
2.6.2 Quinolinas e derivados.....	24
2.6.3 Antifolatos.....	25
2.7 Plantas medicinais	26
2.7.1 <i>Carapa guianensis</i>	27
2.7.2 Propriedades medicinais de <i>Carapa guianensis</i>	28
2.8 Utilização de modelos experimentais na malária	29
3 JUSTIFICATIVA	30
4 OBJETIVOS	31
4.1 Objetivo geral.....	31
4.2 Objetivos específicos.....	31
5 MATERIAL E MÉTODO	31
5.1 Obtenção do material botânico.....	31
5.2 Preparo e rendimento do extrato acetônico de <i>Carapa guianensis</i>	32
5.3 Caracterização química do extrato acetônico de <i>Carapa guianensis</i>	32
5.4 Animais.....	33
5.5 Avaliação da toxicidade oral aguda.....	33
5.6 Infecção experimental por <i>Plasmodium</i> para a indução da malária.....	34
5.7 Manutenção da cepa de <i>Plasmodium berghei</i>	35
5.8 Delineamento experimental.....	35

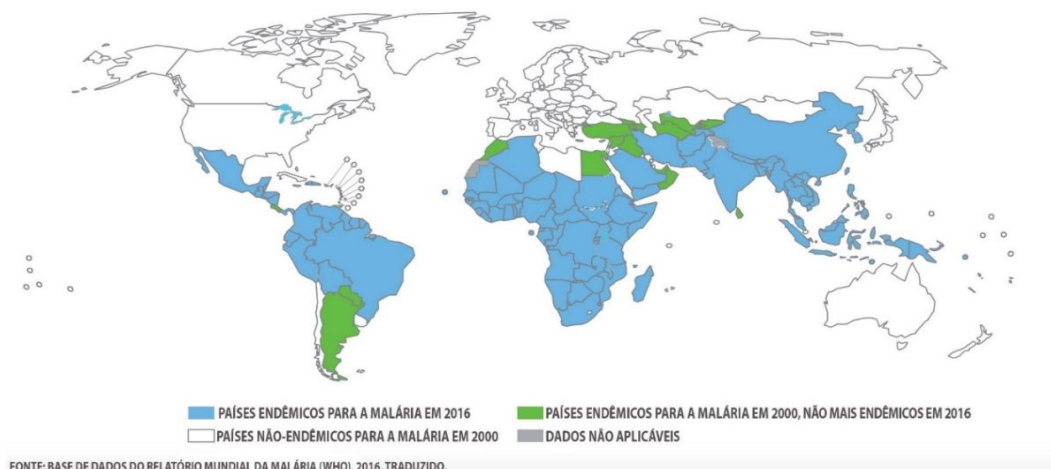
5.9	Determinação da densidade parasitaria	36
5.10	Análise de sobrevivência dos animais	36
5.11	Procedimento de coleta sanguínea dos animais.....	36
5.12	Avaliação da atividade hemolítica	36
5.13	Análise dos parâmetros hematológicos.....	37
6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37
7	RESULTADOS	38
7.1	Rendimento e composição química do extrato acetônico de <i>Carapa guianensis</i>.....	38
7.2	Avaliação da toxicidade oral aguda	38
7.3	Avaliação da atividade hemolítica	40
7.4	Avaliação da parasitemia	40
7.5	Avaliação do tempo de sobrevivência dos animais	41
7.6	Análise dos parâmetros hematológicos.....	42
7.6.1	Série vermelha	42
7.6.2	Série branca: Contagem global de leucócitos.....	44
8	DISCUSSÃO	45
9	CONCLUSÃO.....	49
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
	ANEXOS	61

1 INTRODUÇÃO

Doença potencialmente fatal, a malária apresenta-se como um grave problema de saúde pública, atingindo milhares de pessoas anualmente em todo planeta (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019). Ocorre em mais de 85 países, onde no ano de 2020 houve aproximadamente 241 milhões de casos da doença, as mortes chegaram a 627 mil. Os maiores números de casos da doença ocorrem na África Subsaariana, Ásia, Mediterrâneo Oriental, Pacífico Ocidental e nas Américas (OPAS, 2020). Na região das Américas o país que mais registra casos da doença é o Brasil, com cerca de 50% das ocorrências (BRASIL,2006).

Figura 1- Distribuição mundial da malária.

PAÍSES ENDÊMICOS PARA A MALÁRIA EM 2000 E 2016



Fonte: Organização Mundial de Saúde (2016)

No Brasil, em 2020 foram notificados 145.188 casos de malária segundo dados do Ministério da Saúde (2022), desses casos 99% ocorreram na região da Amazônia Legal, distribuídos nos estados do Amazonas, Acre, Amapá, Mato Grosso, Maranhão, Pará, Roraima, Rondônia e Tocantins. Isso acontece devido às condições demográficas, ambientais e sociais favoráveis para à manutenção da transmissão da doença nesta região (LAPOUBLE et al., 2015).

Na Amazônia, responsável por grande número de casos da doença no país, está o Estado do Pará, localizado na porção oriental da região norte do Brasil (Amazônia Brasileira), é o segundo maior estado do país em extensão territorial (CORDEIRO, 2002). A região paraense é endêmica por oferecer ao vetor características geográficas (adequadas à proliferação vetorial), ecológicas (intenso desmatamento), biológicas (presença de altas

densidades de vetores) e socioeconômicas (vários grupos populacionais morando próximas ou dentro de áreas florestais) que facilitam a sua transmissão (CONFALONIERI, 2005).

No ano de 2020 o Estado do Pará registrou aproximadamente 24.556 mil casos confirmados de malária, sendo sua maioria nas Regiões do Baixo Tocantins, Região do Marajó II e Região do Tapajós. A transmissibilidade em geral acontece em áreas rurais, como, assentamentos, comunidades ribeirinhas, garimpos e áreas indígenas, muito característico dessas regiões, porém, também são notificados casos da doença em áreas urbanas e periurbanas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022). Para essas populações tradicionais, que são responsáveis por grande parte dos números de casos da doença, as plantas medicinais apresentam-se como uma das principais alternativas de tratamento devido às influências culturais e ao custo proibitivo dos produtos farmacêuticos.

O uso de plantas medicinais para tratar várias doenças incluindo a malária, faz parte da cultura popular de vários países, o interesse pela medicina tradicional aumentou consideravelmente entre usuários, pesquisadores e serviços de saúde (ROSA et al., 2011). O estudo dessas plantas parte inicialmente do seu uso pelas comunidades, tornando-se mais viável para a elaboração de pesquisas farmacológicas. Na Amazônia as plantas medicinais apresentam-se como uma opção de tratamento principalmente pelas populações tradicionais, e entre as espécies de plantas medicinais utilizadas empiricamente, está a espécie de *Carapa guianensis*.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Características da malária

A malária é uma doença infecciosa, febril de evolução aguda, não contagiosa, que traz como agente etiológico protozoário do gênero *Plasmodium* (MACIEL et al., 2011). O parasita responsável pela malária pertence ao filo Apicomplexa, subordem haemosporina e família *Plamodidae*. São cinco espécies de *Plasmodium* reconhecidas como agentes etiológicos da malária em seres humanos: *P. malariae*, *P. vivax*, *P. falciparum*, *P. ovale* e *P. knowlesi* (recentemente encontrado na Malásia) (CHAVES et al., 2015).

Os vetores responsáveis pela transmissão da malária são insetos da ordem dos dípteros da família Culicidae do gênero *Anopheles*, popularmente conhecidos por mosquito-prego, carapanã, bicuda e muriçoca. No Brasil, existem cinco espécies consideradas como

vetores principais da doença: *A. darlingi*, *A. aquasalis*, *A. albitarsis*, *A. cruzi* e *A. bellator* (MINISTERIO DA SAÚDE, 2019).

Dentre todas as espécies a infecção por *P. falciparum*, é responsável pelo maior número de óbitos, seguido do *P. vivax*, sendo amplamente distribuído pelos trópicos. (GARCIA, 2010). O *P. ovale* e o *P. malariae* estão distribuídos pela África tropical e em outras grandes áreas endêmicas da doença no planeta (ROUCHER *et al.*, 2014). O *Plasmodium knowlesi* é um parasita encontrado na natureza em macacos, entretanto, tem-se observado casos de malária em seres humanos ocasionada pelo *P. knowlesi* em todo Sudeste Asiático, constituindo a quinta espécie de *Plasmodium* que causa malária em humanos (SINGH & DANESHVAR, 2013; WHITE, 2008). Sem uma vacina, a prevenção, diagnóstico e tratamento são as principais recomendações da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2016).

2.2 Transmissão e ciclo biológico do *Plasmodium*

A transmissão da malária ocorre por via vetorial, por meio da picada da fêmea do mosquito *Anopheles* infectada por protozoário do gênero *Plasmodium*. No Brasil, o *Anopheles darlingi*, é o principal vetor da doença, esses mosquitos são encontrados picando durante todo o período noturno, porém, também são encontrados realizando repasto sanguíneo ao amanhecer e ao entardecer. Seus criadouros são preferencialmente locais com água limpa, sombreada, quente e de baixo fluxo, característico da Amazônia Brasileira (BRASIL, 2006; MINISTERIO DA SAÚDE, 2019).

Figura 2 – Mosquito *Anopheles darlingi*



Fonte: Adaptado da Universidade Federal de Minas Gerais (2017).

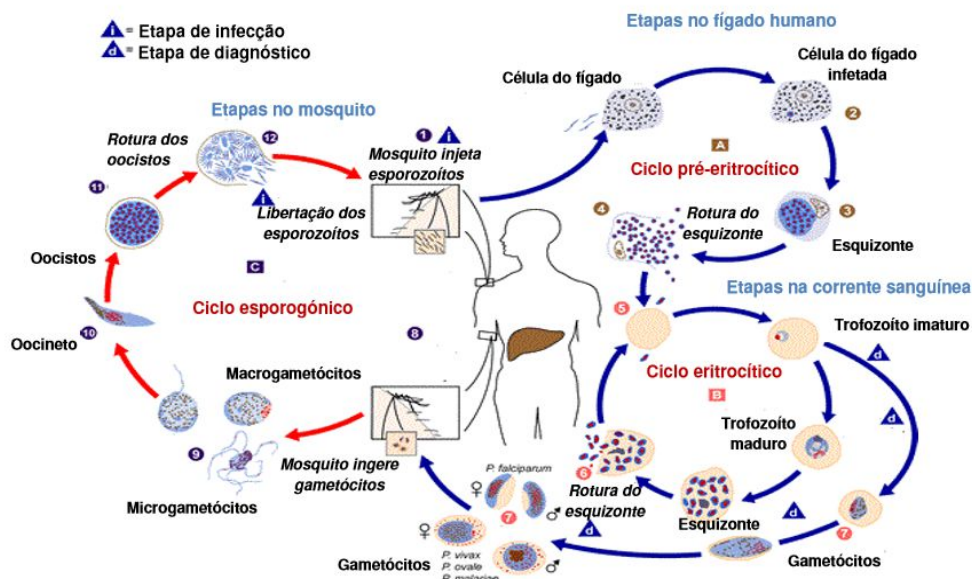
O ciclo do *Plasmodium* é heteroxênico, ou seja, para completar o seu ciclo biológico de vida ele precisa de dois hospedeiros diferentes: um vertebrado (hospedeiro intermediário) onde ocorre a fase assexuada e outro invertebrado (hospedeiro definitivo) onde ocorre a fase sexuada do ciclo (RÍOS VELÁSQUEZ, 2014; VENTURA, 2010).

A infecção se inicia durante o repasto sanguíneo, onde as fêmeas anofelinas inoculam os esporozoítos (presentes nas glândulas salivares) nos capilares cutâneos do homem, esses esporozoítos introduzidos na corrente circulatória chegam aos hepatócitos, onde se multiplicam por divisão assexuada, também chamada de esquizogonia pré-eritrocítica (por preceder obrigatoriamente a fase de parasitismo intraeritrocitário) originando os esquizontes, que por sua vez, se segmentam formando milhares de elementos filhos, os merozoítos (PESSOA, 1982; REY, 1992; MINISTERIO DA SAÚDE, 2019).

Nas espécies de *P. vivax* e *P. ovale*, alguns esporozoítos permanecerão em estágio de latência no fígado, chamados de hipnozoítos (responsáveis pelas recaídas tardias da doença) (SOULARD *et al.*, 2015). Outros hepatócitos parasitados, rompem-se liberando esses merozoítos, uns serão fagocitados pelas células de Kupffer, enquanto que outros sobreviverão, invadindo os eritrócitos e iniciam o segundo ciclo de reprodução assexuada do *Plasmodium*, o ciclo eritrocítico (REY, 1992).

Após invadirem os eritrócitos, esses merozoítos transformam-se em trofozoítos, dando origem esquizontes sanguíneos, esses esquizontes amadurecem e se diferenciam em merozoítos que invadem outros eritrócitos, repetindo o ciclo constantemente (ANTINORI *et al.*, 2012). Após vários ciclos, alguns merozoítos se transformam em gametócitos (formas sexuadas) denominadas macrogametas (feminino) e microgametas (masculino). Esses gametas dentro das hemácias ficam na corrente sanguínea até que haja um eventual repasto de sangue, sendo assim ingeridos por um anofelino, logo, esses gametas chegam até o intestino delgado do vetor onde sofrem divisão celular se transformando em ookinetos (macrogametas fecundados), esses atravessam o intestino formando cistos, chamados de oocistos. Esses oocistos passam por esporogonia, rompendo-se permitindo que muitos esporozoítos migrem para as glândulas salivares do anofelino, estando completos para uma nova inoculação (BRASIL, 2010).

Figura 3 - Ciclo de vida do *Plasmodium*.



Fonte: Centro de controle e prevenção de doenças (2006).

2.3 Patogenia da malária

Geralmente o quadro clínico da malária pode ser classificado como leve, moderado ou grave, isso vai depender de fatores como a espécie do *Plasmodium* infectante, o tempo transcorrido de infecção, a parasitemia e o grau de imunidade adquirida pelo indivíduo. Os grupos considerados de risco e que estão sujeitos a apresentarem complicações em decorrência da doença estão as gestantes, as crianças e os primoinfectados, principalmente se a infecções for pelo *P. falciparum* (WEISS *et al.*, 2010).

A sintomatologia envolve febre e quando acompanhada de cefaleia e calafrio, constitui a tríade malárica, comum na evolução clínica da doença (VENTURA, 2010). Além disso, outros sintomas como vômito, anorexia, anemia, fadiga e diarreia também podem estar presentes. Caso não tratada de maneira correta a malária pode desenvolver graves complicações, tais como, icterícia, edema pulmonar, obstrução de vasos sanguíneos no cérebro e complicações renais, podendo ainda levar a óbito (FRANÇA *et al.*, 2008).

A infecção ocasionada pelo *P. falciparum* é a mais letal (FRANÇA *et al.*, 2008). Nesse tipo de infecção o indivíduo pode desenvolver anemia grave, icterícia acentuada, hiperparasitemia, edema agudo de pulmão, distúrbios hidroeletrólíticos e equilíbrio ácido-

básico, distúrbios hemorrágicos, insuficiência renal aguda, coma, convulsões, choque circulatório e hipoglicemia acentuada (BRASIL, 2006).

As alterações hematológicas mais comuns na infecção malarial são: anemia, leucopenia, trombocitopenia, eosinopenia e neutropenia (DAVIS *et al.*, 1991; HANSCHIED *et al.*, 2008). A anemia se caracteriza como uma das complicações mais frequentes e acontece em decorrência da destruição dos eritrócitos pelo *Plasmodium*. Nas crianças e nas gestantes o quadro de anemia pode ser ainda mais grave, devido aos índices de hemoglobina na maioria das vezes apresentarem-se inferiores ao de um adulto normal. Além disso, o estado nutricional, infecção pelo vírus HIV, infecção helmínticas e bacteremia, podem acentuar ainda mais o quadro de anemia do indivíduo (SIQUEIRA *et al.*, 2014).

O comprometimento renal durante a infecção pelo *Plasmodium* é um achado frequente e apresenta-se como uma complicação severa que pode levar a óbito. Isso pode ocorrer na infecção por qualquer espécie de *Plasmodium*, porém, é mais frequente na infecção por *P. falciparum* onde as alterações tubulares são mais relevantes que as glomerulares, podendo ir desde um acometimento de pequena monta até necrose tubular aguda e insuficiência renal aguda (IRA). O aparecimento de IRA estabelece um critério de gravidade, evidenciando o comprometimento de outros órgãos ou sistemas, podendo desenvolver choque hipovolêmico, acidose, hipoglicemia e a presença de parasitemia intensa (> 5%). Na infecção pelo *P. malariae* o indivíduo pode desenvolver complicações mais tardias, especificamente insuficiência renal crônica (HALDAR, 2009; PIRES *et al.*, 2001; AGUIAR, 2010; SIMÃO *et al.*, 2003).

O comprometimento hepático pelo *Plasmodium* tornar-se visível, sobretudo, através da icterícia, alteração do nível sérico das aminotransferases e hepatomegalia. Apresenta-se como uma característica histopatológica distinta, podendo alterar o funcionamento do órgão, como o rebaixamento dos fatores que atuam na coagulação, impedimento de metabolizar vários antimaláricos e alterações na gliconeogênese colaborando para o evento de acidose lática e hipoglicemia— aproximando-se, à insuficiência hepática aguda (BAHETI *et al.*, 2003).

A imunidade contra a infecção é um componente da influência de diversos fatores que ajudam a regular as afinidades entre parasito-hospedeiro. A imunidade à malária abrange uma resposta celular e humoral, onde as células T são indispensáveis para produzir anticorpos e na indução da imunidade celular. O *Plasmodium* expõe-se ao sistema imune em maior ou

menor grau levando em conta o seu estágio de desenvolvimento, no hospedeiro seu sistema imune responde aos antígenos parasitários induzindo à resposta imune efetiva contra o parasita ou a imunopatologia (NAHREVANIAN, 2006; VERONESI, 1999). A resistência inata é um estado inerente do hospedeiro independente de qualquer contato prévio com o *Plasmodium*, essa resistência pode proteger total ou parcialmente o indivíduo do processo infeccioso (BRAGA & FONTES, 2000).

Em virtude da exposição natural frequente a malária o indivíduo apresenta uma imunidade ativa natural a curto prazo contra a infecção e para sustentar essa imunidade natural, é necessário que a infecção se repita (MOORTHY *et al.*, 2004). O desenvolvimento da imunidade ativa contra a infecção varia de pessoa para pessoa, mas geralmente os adultos que vivem em regiões de constante exposição ao *Plasmodium* desenvolvem essa imunidade que os protegem durante a vida (DOOLAN *et al.*, 2009). Já a imunidade adquirida está sujeita as condições apresentadas pelo indivíduo como seu estado nutricional, condições de repouso e tratamento medicamentoso. Em regiões naturais de alta transmissibilidade da doença como na África e na Ásia, onde predomínio é do *P. falciparum*, os recém-nascidos são protegidos de malária durante os seis meses de vida (REY, 2001; MIOTO, *et al.*, 2012).

2.4 Diagnóstico

Para diagnosticar essa enfermidade é importante reconhecer o contexto epidemiológico, clínico e laboratorial. É indispensável que se realize uma anamnese para se apurar informações mais detalhadas sobre o indivíduo, como por exemplo, se o mesmo reside em área endêmica ou se permaneceu em zona de risco de infecção, se possui histórico de transfusão sanguínea ou padrões de febre intervalados (KOOGAN, 2009).

O diagnóstico precoce atua como forma de controle dessa doença, pois possibilita o tratamento antes que haja uma maior progressão de transmissão. No entanto, alguns sintomas causados pela malária são parecidos com a sintomatologia de outras doenças, tais como: hepatite viral, dengue e leptospirose, entre outras, o que de certa forma dificulta o seu diagnóstico (COSTA *et al.*, 2010).

Com o intuito de minimizar esse problema, foram desenvolvidos métodos de diagnóstico para se detectar o parasita ou seus subprodutos, apresentando cada um suas vantagens e desvantagens em relação ao seu uso, desempenho, custo e praticidade. Para que

haja eficácia no tratamento é necessário que se tenha um diagnóstico célere e correto, além de se utilizar as drogas antimalárica mais adequada e no tempo mais breve possível. O diagnóstico pode ser dividido em clínico e laboratorial (GLÓRIA, *et al.*, 2018).

2.4.1 Diagnóstico clínico

Estudos recentes demonstram que a demora no diagnóstico é um fator agravante da doença, sobretudo se for causada por *P. falciparum*. O diagnóstico clínico é realizado em decorrência de sinais e sintomas sugestivos de infecção, como febre de 40°C ou mais, seguida de calafrios, sudorese profusa e cefaléia, em padrões recorrentes. Podem aparecer ainda sinais prodrômicos, a exemplo de vômitos, náuseas, astenia, fadiga. Outros sintomas típicos da malária: anemia hipocrômica, com hematócrito alto no período febril, esplenomegalia dolorosa, quadro clínico ligado à história epidemiológica de residência ou procedência de área endêmica, e a resposta rápida a utilização de antimaláricos podem ajudar a fechar o diagnóstico (BRASIL, 2004).

2.4.2 Diagnóstico laboratorial

Há anos a microscopia óptica é considerada como padrão ouro para detecção da malária (MURPHY *et al.*, 2013). O teste microscópico tem propriedades desejáveis, como baixo custo, especificidade e alta sensibilidade. Por esses motivos, se sustenta como padrão ouro para detecção da doença. Apesar disto, existem outros métodos utilizados para o seu diagnóstico, como o ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), imunofluorescência, testes imunocromatográficos rápidos, PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) e outros (GLÓRIA, *et al.*, 2018).

O diagnóstico da infecção é efetivado pela visualização microscópica do *Plasmodium* em exame de esfregaço delgado ou gota espessa, corado pela técnica de Giemsa ou Walker. Além de facilmente acessíveis, ambas permitem indicar a espécie do *plasmodium*. Esses métodos também quantifica a intensidade do parasitismo, mediante determinação da parasitemia por volume de microlitro ou milímetros cúbicos (μl ou mm^3) de sangue (GOMES *et al.*, 2011; BRASIL, 2005).

Os diagnósticos sorológicos se baseiam na interação entre antígenos do parasita com anticorpos produzidos contra estes parasitas em pessoas infectadas, utilizam-se técnicas como ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) ou imunofluorescência (TANGPUKDEE *et*

al., 2009). Os testes de diagnóstico rápido (TDR) para a infecção consistem em anticorpos contra antígenos característicos do *plasmodium* retidos em membranas de nitrocelulose e unidos a partículas de ouro, que migram na fase líquida de sangue de indivíduos com suspeita da doença (MOODY, 2002). Além disso, várias pesquisas têm enfatizado a utilização da reação em cadeia da polimerase (*polymerase-chain reaction* – PCR) como método de detecção de DNA de *Plasmodium* circulante (LASERSON *et al.*, 1994). A PCR possibilita rapidamente uma análise mais sensível e específica que as outras (PERANDIN *et al.*, 2004; MANGOLD *et al.*, 2005).

2.5 Vacina

Na busca pela erradicação da malária, tem-se incentivado o desenvolvimento de uma vacina eficaz, essa vacina é necessária para que haja o controle dessa doença, uma vez que os *Plasmodium* resistentes aos antimaláricos e a resistência dos mosquitos aos inseticidas trazem grande consequências para a saúde das populações de países endêmicos. O conhecimento sobre o ciclo evolutivo do *Plasmodium* é necessário para se compreender os possíveis alvos a serem atingidos pelas vacinas antimaláricas, essas vacinas focam nos três estágios do ciclo do parasito, são elas: vacinas com atuação nas formas pré-eritrocíticas ou vacinas bloqueadoras da infecção (esporozoítos e/ou formas teciduais hepáticas); vacinas para as formas assexuadas eritrocitárias ou modificadoras da doença (merozoítos); e as vacinas para as formas sexuadas ou bloqueadoras da transmissão (gametócitos) (FRASSON *et al.*, 2009; CHAVES *et al.*, 2015).

O *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium vivax* são os mais estudados para o se desenvolver essas vacinas. A vacina RTS,S/AS01 (Mosquirix™) foi desenvolvida para combater a malária ocasionada pelo *P. falciparum*, e encontra-se em estudos mais avançados de fase III onde sua ação é na fase pré-eritrocítica. Desde 2019 a RTS,S/AS01 está sendo testado por um programa piloto no Quênia, Gana e Malauí, ultrapassando mais de 800 mil crianças imunizadas. O uso da vacina RTS,S/AS01 em associação com os antimaláricos contribuíram para a redução do número de casos graves de malária em crianças no continente africano. A eficácia e proteção da vacina ultrapassa 39% em novos casos e 29% em casos graves. O desenvolvimento dessas vacinas evitaria as formas graves da malária, com o principal objetivo de reduzir a morbimortalidade da doença nas áreas endêmicas (CHAVES *et al.*, 2020).

2.6 Fármacos Antimaláricos

Entre as décadas de 50 e 60, foi lançado pela Organização Mundial de Saúde um programa que buscou erradicar a malária. Esse programa estava fundamentado na utilização de fortes inseticidas e drogas antimaláricas, e tinha como finalidade interromper o ciclo biológico homem-mosquito por um período aceitável até que reservatório do vetor desaparecesse. Porém, na década de 70 observou-se uma falha no programa em razão de fatores econômicos, administrativos e biológicos, o que resultou na resistência parasitaria aos antimaláricos tradicionais (DIAS; FREITAS 1997; TARANTO *et al.*, 2006).

Os medicamentos utilizados em seu tratamento são oriundos de produtos naturais ou sintetizados a partir deles, produzidos desde 1940 (FRANÇA *et al.*, 2008). Sem uma vacina, seu tratamento e profilaxia são realizados através dessas drogas. A resistência do *Plasmodium* as diversas classes de fármacos disponíveis apresentam-se em muitas regiões endêmicas ao redor do mundo (COSTA, 2017).

Comumente boa parte dos fármacos antimaláricos atuam na fase eritrocítica do parasito. Os principais antimaláricos podem ser classificadas: pelo seu grupo químico em arylaminoálcoois (quinina, mefloquina e halofantrina), 4-aminoquinolinas (cloroquina e amodiaquina), 8-aminoquinolinas (primaquina), peróxido de lactona sesquiterpênica (derivados da artemisinina), naftoquinonas (atovaquona) e antibióticos (tetraciclina, doxiciclina e clindamicina), e pelo seu alvo de ação no ciclo biológico do parasito em esquizonticidas teciduais ou hipnozoiticidas (cura radical do *P. vivax*), esquizonticidas sangüíneos (promovem a cura clínica), gametocitocidas (bloqueia a transmissão) e esporonticidas (impede a infecção pelos esporozoítos) (BRASIL, 2001).

A efetividade de um antimalárico é oferecida segundo as interações entre a droga e o *plasmodium* – toxicidade seletiva e resistência aos fármacos – e entre a droga e o hospedeiro por meio da farmacocinética e da farmacodinâmica. Um medicamento ideal é seletivo para o parasito e proporciona atividade terapêutica sem ou com pouquíssima toxicidade para o hospedeiro (DESHPANDE *et al.*, 2016). O tratamento correto, ou seja, seguindo dosagem e tempo recomendados, objetiva garantir um tratamento clínico rápido e duradouro, além de impedir a aparição das formas graves da doença e evitar o desenvolvimento da resistência medicamentosa do *Plasmodium* (OSÓRIO-DE-CASTRO *et al.*, 2011). Quando tratada a tempo, é muito difícil ocorrer morte por malária em indivíduos sem comorbidades (TARANTO *et al.*, 2006).

2.6.1 Artemisinina e seus derivados

Em meio aos fármacos utilizados no tratamento e quimioprofilaxia da malária, destaca-se a artemisinina por ser o antimalárico cuja resistência dos *Plasmodium* não possui relevância clínica. A artemisinina (*qinghaosu*) é adquirida através da extração de plantas do gênero *Artemisia* apresentando-se em maior quantidade na espécie *A. annua* (HSU, 2006). É de origem chinesa, usada pela medicina chinesa para tratar a malária desde o século II a.C (FRANÇA *et al.*, 2008).

Trata-se de uma lactona de sesquiterpeno com um peróxido como ponte de ligação. A porção ligada ao peróxido parece ser responsável pela atividade antimalárica. A artemisinina e seus derivados estão entre os esquizotomicidas sanguíneos de ação rápida, agindo na eliminação do parasito e melhorando os sintomas em menos tempo quando comparados a cloroquina ou a quinina (BRASIL,2001). Contudo, estudos atuais sugerem que o uso descontrolado do fármaco, e de seus derivados, podem criar condições adequadas para o surgimento de *Plasmodium* resistentes (JAMBOU *et al.*, 2005).

A artemisinina contém baixa toxicidade em comparação a quinina, desta forma, ocasiona pouco efeitos adversos. Apesar disso, oferece baixa biodisponibilidade, sendo pouco solúvel em água ou óleo (DE DONNO *et al.*, 2012). A diidroartemisinina é uma derivação do composto solúvel em óleo e o artesunato de sódio e ácido artelínico solúveis em água. Ambos possuem ação esquizotomicida sanguínea mais forte quando comparado ao composto precursor, combatendo parasitos resistentes a vários antimaláricos (BRASIL, 2001).

Os estudos com derivados da artemisinina, comprovam que sua atividade se dá por conta da indução da formação de radicais livres que alquilam ou oxidam proteínas e lipídios dentro dos eritrócitos infectados (KANNAN *et al.*, 2005). Outro diferente modo de ação indicado é que a artemisinina e seus derivados necessitam serem acionados por clivagem redutora, capaz de alquilar enzimas do *Plasmodium*, induzindo à morte do parasito (WU, 2002).

2.6.2 Quinolinas e derivados

A quinina, composto isolado da árvore Cinchona, oriunda da América Central e do Sul, foi o primeiro composto usado para tratar a malária (BARREIRO *et al.*, 2009; GREENWOOD *et al.*, 2008). A sua estrutura química é composta, sobretudo por um alcalóide

(anel heterocíclico contendo nitrogênio com um par de elétrons não-ligante) responsável pela atividade antimalárica da substância (LA-SCALEA *et al.*, 2007)

Após ser descoberto, o uso e a demanda por quinina se expandiram pela América do Norte, Ásia e Europa, onde na metade do século XX esse composto passou a ser considerado o principal quimioterápico empregado para tratar a infecção pelo *Plasmodium*. No entanto reduziu-se sua utilização devido sua elevada toxicidade, além do aparecimento de *P. falciparum* resistentes (FRANÇA *et al.*, 2008).

Muitos fármacos foram sintetizados da estrutura química da quinina, resultando na síntese de muitas aminoquinolinas e amino-álcoois relacionados, incluindo a cloroquina, amodiaquina, mefloquina e piperquina (GRYZLO; KULIG, 2014). Estes apresentam ação bastante semelhante a quinina (SÁ *et al.*, 2011). E tem ação esquizotóxica, ativa contra formas eritrocíticas assexuadas de *P. falciparum* e *P. vivax*, e não possui efeito sobre as formas hepáticas do parasita (ACHAN *et al.*, 2011).

O mecanismo de ação das quinolinas continua pouco esclarecido sendo alvo de muitos estudos. Entretanto, seu principal mecanismo de ação se demonstra estar ligado ao acúmulo de bases fracas no lisossomo ácido do *Plasmodium* junto com a ligação de ferriprotoporfirina-IX (do grupo heme da hemoglobina), impedindo com isso a polimerização do mesmo por parte da ferriprotoporfirina-IX polimerase evitando assim seu mecanismo de detoxificação, essa concentração de ferriprotoporfirina-IX ocasiona a morte do parasito (ROBERT *et al.*, 2001; SILVA *et al.*, 2005). No Brasil, a quinina permanece sendo a droga de escolha para tratar a infecção por *P. falciparum* não grave ou complicada, em associação com doxiciclina ou tetraciclina (BRASIL, 2001).

2.6.3 Antifolatos

Em 1960 surgiram cepas de *P. falciparum* cloroquina-resistentes, os medicamentos sulfadoxina e pirimetamina combinados tornaram-se fortemente utilizados para se tratar a infecção. Essas duas drogas atuam seletivamente sobre enzimas envolvidas no ciclo dos folatos, importantes em processos bioquímicos vitais do parasita, como na síntese de aminoácidos, proteínas e DNA (SILVA, 2013).

Os antifolatos estão entre as classes de medicamentos antimaláricos mais usados atualmente, em decorrência do aparecimento de *Plasmodium* resistentes ao tratamento, sua eficiência tornou-se prejudicada. Os antifolatos usados para tratar a malária são distribuídos em duas classes: inibidores da dihidropteroato sintase (DHPS) e inibidores da dihidrofolato redutase (DHFR) (SCHUCK, 2013).

Os inibidores da DHFR são fortes agentes esquizotomicidas e agem sobre as formas assexuadas do *plasmodium*, são algumas dessas drogas a pirimetamina e a trimetoprima. Nos inibidores da DHPS temos a sulfadoxina e as sulfonas drogas muito utilizadas no tratamento (FRANÇA *et al.*, 2008). Entretanto alguns novos antifolatos, onde a estrutura e atividade são da pirimidina e triazina estão em processo de desenvolvimento com grandes potenciais antimaláricos (SAHU *et al.*, 2008).

As combinações de drogas com potencial antimalárico existentes com determinadas características farmacocinéticas e farmacodinâmicas, visam aumentar a eficácia terapêutica e diminuir ou retardar a seleção de parasitos resistentes. Para isso são utilizados alguns medicamentos em combinação, como por exemplo a lumefantrina, amodiaquina, mefloquina e sulfadoxina-pirimetamina (AGUIAR *et al.*, 2012). No Brasil, a política nacional de tratamento da malária orienta toda a terapêutica e disponibiliza gratuitamente os medicamentos antimaláricos utilizados por todo o território nacional, através do Ministério da Saúde (LEITE *et al.*, 2013).

2.7 Plantas medicinais

Há comprovações de que há milênios os produtos naturais são utilizados na terapêutica de diversas patologias humanas (LAHLOU, 2013). Os registros demonstram que desde a era paleolítica as plantas já eram usadas como remédio (SAAD *et al.*, 2009). O uso de plantas medicinais é um dos métodos mais antigos utilizados pela humanidade e, ainda hoje, representam para muitos grupos étnicos e comunidades, a única forma de tratamento, cura e prevenção de várias doenças (VEIGA *et al.*, 2005).

A Organização Mundial de Saúde estima que 80% da população em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento utilizam a medicina tradicional com plantas. Buscou-se então a necessidade de se valorizar a utilização de plantas medicinais na atenção básica à saúde (ROSA *et al.*, 2011). Nos últimos anos, tem-se constatado a necessidade de se buscar e desenvolver novos fármacos. Isso acontece em decorrência dos altos índices e prevalência de enfermidades que não têm tratamentos e/ou cura satisfatória em humanos e animais, o que de certa forma favorece a realização de pesquisas de bioprospecção de novas fontes de moléculas bioativas (STROBEL & DAISY, 2003).

No Brasil, a vasta biodiversidade de flora, é vista pelos pesquisadores como uma mina de substâncias biologicamente ativas (BARREIRO *et al.*, 2002). Na Amazônia inúmeras

espécies de plantas são utilizadas na medicina tradicional para tratar doenças infecciosas (FUNASA, 2002). Porém, grande parte das plantas medicinais da flora nativa são consumidas com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas (VEIGA *et al.*, 2005). Uma das plantas utilizadas com finalidade terapêutica é a *C. guianensis* objeto de estudo desta pesquisa.

2.7.1 *Carapa guianensis*.

A *C. guianensis* faz parte da família botânica Meliaceae, com cerca de 51 diferentes gêneros e aproximadamente 550 espécies, sendo encontradas em regiões tropicais e subtropicais da América, Ásia, Austrália, África e Nova Zelândia. No Brasil essa família é constituída por 7 gêneros, sendo: Swietenia, Guarea, Cedrela, Khaya, Cabralea, Trichilia e Carapa (MIRANDA JÚNIOR, 2014). A *C. guianensis* (AUBLET, 1775) é encontrada nos estados do Pará, Amapá e Maranhão, Acre e Amazonas (BRASIL, 2021).

É popularmente conhecida como andiroba-do-igapó, andiroba, jandiroba, penaiba, carapá, aldirova e em inglês de crabwood, entre muitos outros nomes populares. Em tupi-guarani andiroba quer dizer “gosto amargo”, característica designada em virtude dos limonoides achados em seu tronco, galhos e sementes (DA SILVA *et al.*, 2009). A árvore de andiroba pode atingir de 25-50 metros de altura, possui um tronco cilíndrico e reto, tem uma casca espessa muito amarga de coloração avermelhada ou acinzentada, que se desprende em grandes pedaços. Esta árvore produz um ouriço arredondada que quando maduro cai e libera sementes que contém um óleo amarelo-claro, utilizado como produto fitoterápico (NASCIMENTO *et al.*, 2019).

Figura 4 – *Carapa guianensis*



Fonte: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa (2022).

O uso fitoterápico desta espécie vem desde o tempo do Brasil colônia. Na Amazônia, a população, de uma forma geral, costuma utilizar a andiroba no tratamento contra tosse, convulsões, doenças de pele, artrite, reumatismo, infecções de ouvido, para curar feridas, contusões, como repelente de insetos e também para tratar os sintomas relacionados à malária (DA SILVA *et al.*, 2014).

A andiroba é uma árvore tropical com fortes características e de uso múltiplo, é valorizada tanto pelo óleo extraído de suas sementes com pela alta qualidade de sua madeira. É cultivável na região amazônica e sua semente é muito utilizada na industrialização de frutos nativos da região, o resíduo gerado da semente na maioria das vezes é desprezado, podendo ser utilizado para a obtenção de subproduto da andiroba (KLIMAS *et al.*, 2007).

2.7.2 Propriedades medicinais de *Carapa guianensis*.

Praticamente todas as partes da *C. guianensis* são utilizadas para algum fim terapêutico na medicina popular no Brasil, assim como em outros países que englobam a floresta amazônica. A partir das sementes desta espécie os povos nativos da Amazônia extraem o óleo da andiroba, que é tradicionalmente utilizado como antipirético, anti-malárico, inseticida, anti-inflamatório e repelente (MIRANDA *et al.*, 2012). A tabela 1 mostra varios autores que identificaram algumas de suas suas propriedades medicinais.

Tabela 1- Relação das propriedades medicinais de *Carapa guianensis*.

AUTORES	PROPRIEDADES MEDICINAIS
(SANTOS <i>et al.</i> , 2016)	Inseticida
(SILVA <i>et al.</i> , 2006)	Larvicida
(DE AMORIM <i>et al.</i> , 2020)	Anti-helmíntica
(DE SOUZA <i>et al.</i> , 2017)	Anti-inflamatório
(NONATO <i>et al.</i> , 2018)	Cicatrizante
(DE SOUSA <i>et al.</i> , 2018)	Antifúngica
(SILVA & ALMEIDA, 2014)	Antibactericida

Fonte: Próprio autor.

Vários estudos realizados com a *C. guianensis* confirmaram que esta espécie possui atividade antiviral (PROPHIRO *et al.*, 2012), antiparasitária (MIRANDA JÚNIOR *et al.*, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2018), cicatrizante (NAYAK *et al.*, 2010), e antioxidante (ARAÚJO-

LIMA *et al.*, 2018). Não encontramos na literatura trabalhos que descrevam a atividade antimalárica do extrato acetônico do resíduo industrial de *C. guianensis*.

As propriedades medicinais da andiroba são atribuídas aos Limonóides tetranotriterpenóides, incluindo 6 α -acetoxigedunina, 7-desacetoxi-7-oxogedunina, andirobina, gedunina e metil-angolensato que são de grande interesse para os pesquisadores devido às suas variedades estruturais e atividades biológicas. Eles contêm átomos de oxigênio que conferem uma polaridade moderada e são responsáveis pelas dificuldades na sua separação por meio de métodos cromatográficos tradicionais (TAPPIN *et al.*, 2008). No tronco, nos galhos e nas sementes de andiroba foram identificados limonoides, flavonoides, triacilglicerídeos, cumarinas, monoacilglicerídeos, metilbenzoatos triterpenos, flavanas, e ácidos graxos saturados (PENIDO *et al.*, 2005).

Os limonóides oferecem uma polaridade mediana, sendo solúvel em ésteres, cetonas e clorados, além de uma baixa polaridade em água e hexano. Nos últimos anos os estudos científicos sobre esta espécie têm levado há muitas investigações sobre suas propriedades farmacológicas. O interesse científico e comercial sobre a *C. guianensis* vem crescendo a cada ano (TAPPIN *et al.*, 2008).

2.8 Utilização de modelos experimentais na malária

Em virtude da impossibilidade de se realizar estudos em humanos para se entender os eventos que ocorrem durante a infecção pelo *Plasmodium* utilizam-se os modelos experimentais na pesquisa (NITCHEU *et al.*, 2003). Vários modelos experimentais foram desenvolvidos em primatas não humanos, ratos e camundongos, embora possuam algumas limitações esses modelos apresentam certas características da malária humana (BASIR *et al.*, 2012).

Os modelos *in vivo* são utilizados para avaliar a atividade antimalárica de um composto, o uso de modelos animais em testes *in vivo* está associado a questões éticas totalmente indispensáveis. Entre os modelos experimentais que mais se assemelham a doença em humanos, está o modelo murino (roedores). Existem quatro espécies de *plasmodium* oriundas de roedores africanos e adaptados para o uso em camundongos: *P. berghei*, *P. chabaudi*, *P. vinckei* e *P. yoelii*. (NOGUEIRA & ROSÁRIO, 2010; NITCHEU *et al.*, 2003).

Essas espécies de *P. murino* apresentam várias particularidades, tornando-as ideais para diferentes tipos de pesquisa. O *P. chabaudi* é utilizado principalmente em estudos sobre os mecanismos de resistência a drogas antimaláricas e evasão do sistema imune. O *P. yoelii* é usado em pesquisas sobre o estágio extra eritrocítico, tais como o estágio hepático e a ação do sistema imune nessas formas. O *P. vinckei* é utilizado para estudos de cronobiologia e o *P. berghei*, caracteriza-se por gerar uma infecção grave, deste modo é indicado em estudos que envolvem a malária grave, como por exemplo, a malária cerebral (OTTO *et al.*, 2014; JUNQUEIRA, 2007).

Grande parte das pesquisas com modelos experimentais utilizam o modelo de infecção por *P. berghei* ANKA, oferecendo uma divisão segura entre linhagens de camundongos resistentes (BALB/c e A/J) e susceptíveis (C57Bl/6 e CBA). Algumas pesquisas relatam que camundongos geneticamente susceptíveis e infectados com a cepa ANKA estão sujeitos a apresentar manifestações clínicas parecidas com a infecção por *P. falciparum* (VAN DER HEYDE *et al.*, 2006). Deste modo, estes modelos experimentais estão sendo amplamente aproveitados principalmente em razão da facilidade de manuseio, observação e criação desses animais em laboratório.

3. JUSTIFICATIVA

Mundialmente conhecida, a malária é uma doença de alta prevalência em países em desenvolvimento, atualmente é responsável por mais de um milhão de mortes a cada ano no mundo e mesmo assim se apresenta como uma doença negligenciada. No Brasil, estima-se que 99% dos casos ocorram na região amazônica, isso acontece devido às condições propícias que a região oferece para a proliferação do vetor. No ano de 2020, o Estado do Pará ocupou o segundo lugar dessa região com mais números de casos da doença, ultrapassando 24 mil notificações. Sabe-se que a região amazônica possui uma extensa área geográfica, o que de certa forma dificulta as estratégias de controle da doença na região, além de existirem fatores determinantes relacionados ao aumento no número de casos, como a falta de uma vacina eficaz, a resistência dos *Plasmodium* aos medicamentos padrão, limitado o arsenal terapêutico e a toxicidade dos fármacos existentes.

Nesse contexto, o uso de plantas medicinais representa uma alternativa terapêutica viável no tratamento da malária, principalmente em locais com difícil acesso ao tratamento, como na região Amazônica. No entanto, a validação científica do conhecimento tradicional

sobre as plantas medicinais é primordial, pois direcionam as pesquisas para o desenvolvimento de novas moléculas bioativas que podem levar a produção de fármacos semissintéticos ou sintéticos com maior eficácia e menos nocivos ao organismo humano. A resistência do *Plasmodium* aos fármacos existentes e a falta de uma vacina eficaz de uso global são fatores importantes determinantes na busca por novas opções de tratamento. A flora brasileira apresenta uma rica biodiversidade de recursos naturais inexplorados e diversas espécies com potencial para serem investigadas. O estudo da espécie *C. guianensis*, objeto desta pesquisa, visa corroborar com outros estudos que investigam moléculas com possível atividade antimalárica e assim, contribuir com o tratamento da malária.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antimalárica do extrato acetônico de *Carapa guianensis* em modelos experimentais *in vivo* de malária induzida pelo *Plasmodium berghei* em camundongos BALB/c.

4.2 Objetivos específicos

- Avaliar a toxicidade aguda *in vivo* do extrato acetônico de *C. guianensis*.
- Avaliar a atividade hemolítica do extrato acetônico de *C. guianensis*.
- Analisar o potencial antimalárico do extrato acetônico de *C. guianensis*, pelo seu efeito na redução da parasitemia de camundongos com malária;
- Analisar a sobrevivência dos animais com malária e tratados com o extrato acetônico de *C. guianensis*.
- Avaliar os parâmetros hematológicos dos animais com malária, e tratados com o extrato acetônico de *C. guianensis*.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Obtenção do material botânico

O resíduo industrial da andiroba utilizado nesta pesquisa foi gentilmente cedido pela empresa extratora de óleo vegetal AmazonOil localizada na cidade de Ananindeua-PA. O

resíduo vegetal foi enviado para a Universidade Federal do Oeste do Pará - UFOPA, onde foi utilizado nos testes do estudo. A espécie botânica foi identificada pela empresa extratora AmazonOil.

5.2 Preparo e rendimento do extrato acetônico de *Carapa guianensis*

O preparo do extrato acetônico de *C. guianensis* foi realizado no laboratório de Farmacologia da Universidade Federal do Oeste do Pará - UFOPA, Unidade Tapajós. Foi utilizado 200g de resíduo industrial triturado em mash 20 e colocado em saco de papel filtro 12x6 para extração no aparelho soxhlet.

Figura 5: Extração do extrato acetônico do resíduo industrial de *C. guianensis*.

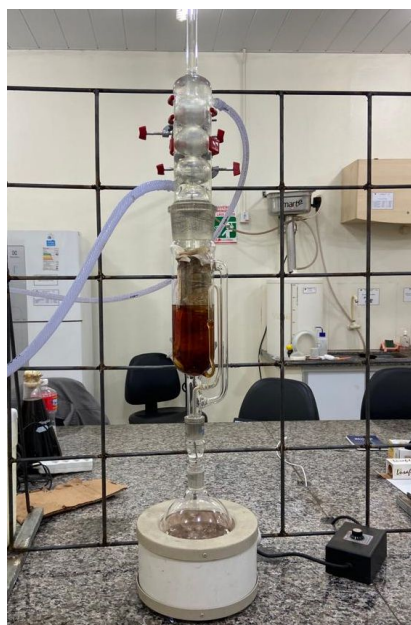


Foto: Própria autora.

O solvente orgânico escolhido para extrair o extrato do resíduo industrial da *C. guianensis* foi a Acetona, sendo três tratamentos: 8 horas, 12 horas e 16 horas de extração com 5 repetições cada. Os dados obtidos das extrações foram analisadas utilizando o teste ANOVA.

5.3 Caracterização química do extrato acetônico de *Carapa guianensis*

A caracterização química de *C. guianensis* foi realizada por Peron (2017), através do método de Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas sequencial (EM-EM). A identificação dos compostos majoritários do extrato acetônico de *C.*

guianensis foi efetivada através da comparação com os compostos disponíveis na literatura, utilizando a biblioteca (NIST-11).

5.4 Animais

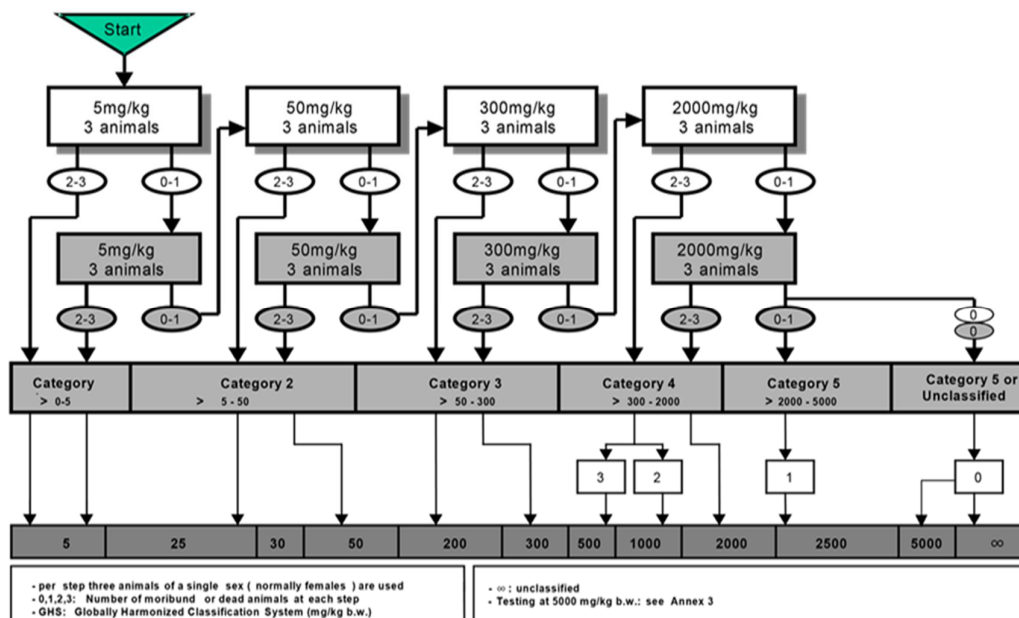
Para a realização dos experimentos envolvendo animais o presente estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade Federal do Oeste do Pará sob o número de protocolo 0520220199.

Para a realização dos experimentos foram utilizados 50 camundongos machos da linhagem BALB/c, pesando em média de 20 a 30 g, oriundos do Biotério da Universidade Estado do Pará, mantido no alojamento do biotério a uma temperatura controlada de 22 ± 2 °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 totalmente os princípios éticos da experimentação animal seguindo todos os critérios estabelecidos pelo Comitê de ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade Federal do Oeste do Pará.

5.5 Avaliação da toxicidade oral aguda

A toxicidade oral aguda foi analisada utilizando o Guia OECD-423/2001 “Toxicidade Aguda de Classes”, onde são usadas doses de (5mg/kg, 50 mg/kg, 300mg/kg ou 2000mg/kg), em um número mínimo de 3 animais por grupo. A dose inicial escolhida foi de 2000mg/kg, conforme estabelece o protocolo para espécies que já possuem estudo prévio de toxicidade aguda para seu gênero. A dose foi testada duas vezes para se definir a categoria toxicológica segundo as especificações do Guia da OECD. As doses foram administradas por via oral (gavagem) e posteriormente, os animais foram avaliados quanto as suas alterações motoras e comportamentais depois de 30 min, 1h, 2h, 3h e 4h após a administração, a partir de então, diariamente até o 14^a dia. Os parâmetros avaliados foram: hipnose, ataxia, anestesia, irritabilidade, lacrimação, respiração, piloereção, reflexo, convulsões, resposta aperto cauda, contorção, tremores, frênilo vocal, ptose, hipotermia, cianose, hiperemia e morte. Todos os animais utilizados no teste foram pesados antes da administração, no 7^o e 14^o dia.

Figura 6 - Protocolo de Toxicidade de Classe – Esquema de doses OECD-423/2001.



Fonte: Adaptado OECD (2001).

5.6 Infecção experimental por *Plasmodium* para a indução da malária

O ensaio foi efetivado por meio do teste adaptado e 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 *P. berghei* (PbA) ANKA em 8 camundongos da linhagem BALB/c.

No primeiro animal infectado e doador, foi coletado uma gota da porção terminal da cauda para análise de densidade parasitária. Esse animal apresentou uma densidade parasitária maior que 10%, e foi submetido a punção cardíaca para a coleta de sangue. O inóculo contendo hemácias parasitadas do animal doador foi administrado por via intraperitoneal nos animais testes.

No 4º dia pós infecção foi realizada coleta de uma gota de sangue da porção terminal da cauda desses animais para análise da densidade parasitária. A avaliação da infecção foi realizada através da contagem de hemácias parasitadas em esfregaço delgado com a execução do cálculo de parasitemia por campo microscópico examinado a determinação do índice de densidade parasitária (BRASIL, 2010a).

5.7 Manutenção da cepa de *Plasmodium berghei*

Inicialmente foi coletado de um animal infectado, uma amostra de sangue através da porção terminal da cauda. Uma alíquota de 20 µL de sangue total foi diluída em solução de PBS, para um volume final de 1000µL. Desta solução, 100 µL foram administrados via intraperitoneal nos animais de repasse, sendo este procedimento repetido semanalmente durante o desenvolvimento do experimento com intuito da manutenção da cepa viva.

5.8 Delineamento Experimental

Os animais foram separados em seis grupos experimentais com 06 animais por grupo:

- Grupo 01 (Controle): os animais receberam tratamento apenas com veículo PBS (Solução Tampão Fosfato Salino), mas não foram infectados com o *P. berghei*.
- Grupo 02 (Malária/*P.berghei*): animais infectados com o *P. berghei*.
- Grupo 03 (Padrão Artemisinina): os animais foram infectados com o *P. berghei* e receberam o tratamento com a Artemisinina 100 mg/kg/dia por via oral.
- Grupo 04 (And/*C. guianensis* 50 mg): animais infectados pelo *P. berghei* e submetidos ao tratamento com extrato acetônico de *C. guianensis* com dose de (50 mg/kg), 24 horas, durante 7 dias consecutivos, via oral.
- Grupo 05 (And/*C. guianensis* 100 mg): animais infectados pelo *P. berghei* e submetidos ao tratamento com extrato acetônico de *C. guianensis* com dose de (100 mg/kg), 24 horas, durante 7 dias consecutivos, via oral.
- Grupo 06 (And/*C. guianensis* 200 mg): animais infectados pelo *P. berghei* e submetidos ao tratamento com extrato acetônico de *C. guianensis* com dose de (200 mg/kg), 24 horas, durante 7 dias consecutivos, via oral.

Todas as doses foram determinadas após o teste de toxicidade aguda. Essas doses correspondem a 1/40, 1/20 e 1/10 da dose máxima avaliada no teste de toxicidade aguda (2000 mg). Todos os tratamentos tiveram início no 4º dia pós infecção, onde foi realizada a primeira verificação da densidade parasitária para a confirmação da infecção. Para se realizar 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.

5.9 A determinação da densidade parasitária

Para a avaliação da parasitemia dos animais, no 3º, 7º e 10º dia após a infecção, foi retirada uma gota de sangue da porção terminal da cauda dos animais, posteriormente colocadas em lâmina pela técnica do esfregaço sanguíneo, corada pelo Método de Giemsa e analisado o quantitativo de células infectadas em um total de 500 hemácias. As porcentagens de parasitemia e de supressão foram determinadas utilizando modelo modificado proposto por Girma (2015):

$$\% \text{ parasitemia} = \frac{\text{número de eritrócitos parasitados}}{500}$$

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

5.10 Análise de sobrevivência dos animais

Em cada grupo experimental foram realizadas análise de sobrevivência após a inoculação do *plasmodium* e tratamento com *C. guianensis*. Esses 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.

5.11 Procedimento de coleta sanguínea dos animais

Após o período de tratamento todos os grupos de animais foram anestesiados com uma associação de xilazina 2% e ketamina 50%, onde foi administrado 0,1 a 0,2 mL/100 mg por via intraperitoneal. Após o procedimento de anestesia, todos os animais foram submetidos a uma punção cardíaca para a retirada de 1 ml de volume sanguíneo, para se realizar a análise bioquímica.

5.12 Avaliação da atividade hemolítica

Após coleta de sangue com uma seringa contendo EDTA, o mesmo foi transferido para um tubo de centrifuga (tipo Falcon®) de 15mL em processo asséptico usando fluxo laminar, adicionado solução salina 0,9% estéril, centrifugado por 5 minutos, 1800rpm a temperatura ambiente. O sobrenadante foi retirado e foi usada a papa de hemácias ressuspendida em solução salina 0,9%. O composto-teste foi diluído em solução de DMSO a 1% e testado nas seguintes concentrações: 1000 a 15,6 µg/ml, em 7 diluições seriadas (1:2)

testados em triplicata e adicionado 100µL da suspensão de hemácias a 1% (v/v) em cada tubo. Após esse procedimento os tubos ficaram em repouso, à temperatura ambiente, por 60 minutos e, posteriormente, foram submetidos à centrifugação por dois minutos a 3000 rpm. Para controle de 100% de hemólise foi feita uma suspensão de hemácias com Triton X-100 1% (v/v). Como controle sem hemólise, utilizou-se solução salina 0,9%. Posteriormente, o sobrenadante foi transferido para uma microplaca de 96 poços e lida em espectrofotômetro a 405nm. O ensaio foi realizado em triplicata e a taxa de hemólise das amostras foi calculada como abaixo:

$$\% \text{ hemólise} = \frac{\text{Abs. da amostra} - \text{Abs. do controle negativo} \times 100}{\text{Abs. do controle positivo} - \text{Abs. do controle negativo}}$$

5.13 Análise dos parâmetros hematológicos

Para a realização do hemograma foi utilizado um Analisador Hematológico Mindray, modelo BC2800 veterinário. Ao final do tratamento foram avaliados os seguintes parâmetros da série vermelha: Contagem Total de Eritrócitos, Quantificação de Hemoglobina, Determinação do Hematócrito, Concentração da Hemoglobina Média (HCM), a Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM), e também contagem total de plaquetas; e a série branca; Número absoluto de Leucócitos, Quantitativo de Linfócitos e Monócitos e o Quantitativo de Neutrófilos (Segmentados).

6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos estatisticamente através do programa Graph Pad Software, San Diego, CA Prism 5.0®. Todos os dados foram analisados de modo quantitativo e submetidos aos testes estatísticos ANOVA seguido do teste de Tukey. *p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01; ***p ≤ 0,001 foram utilizados como nível de significância.

7 RESULTADOS

7.1 Rendimento e composição química do extrato acetônico de *Carapa guianensis*

Após a realização da extração em três diferentes tempos, seguindo a análise de variância ANOVA: pode se formular que a extração de 8 horas difere significativamente da extração de 12 horas, sendo $(p) < 0,01\%$, todavia, a extração de 12 horas não tem diferença significativa da extração de 16 horas, onde $(p) > 0,01\%$. Logo, a extração de 12 horas possui o tempo necessário para obter um bom rendimento.

Tabela 2: Média das extrações do extrato acetônico de *Carapa guianensis*.

TEMPO DE EXTRAÇÃO	8 HORAS	12 HORAS	16 HORAS
MÉDIA	10.0454	12.2786	12.3912

Foto: Autoria própria

Na extração do extrato do resíduo de andiroba com o solvente orgânico acetona pelo soxhlet durante um percurso de 12 horas, o rendimento bruto obtido foi de 52 ml de um total de 200g de matéria bruta inicial. Assim, o percentual de rendimento foi de 26%.

A caracterização química por meio do método de Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas sequencial (EM-EM), levou a identificação de sete compostos majoritários (limonoides) presente na amostra analisada, sendo eles: methyl angolensate (21,17%), 6 α -acetoxygedunin (12,38%), gedunin (8,44%), 7-deacetoxy-7-oxogedunin (6,33%), xylococensin K (4,10%), andirobin (2,60%), e deacetylgedunin. Apesar do limonóide deacetylgedunin ter sido identificado, seu pico apresentou-se muito pequeno, dificultando a determinação de sua área com precisão. Os limonóides identificados representam cerca de 50% da área total do cromatograma nas amostras analisadas.

7.2 Avaliação da toxicidade oral aguda

Não foram registrados morbidade ou quaisquer sinais de intoxicação norteados pelo teste dos animais expostos com alterações nos olhos, pêlos ou mucosa, assim como, nenhum sinal de tremor, salivação, diarreia, sono, letargia ou mortalidade que são determinadas pelo protocolo, permanecendo assim por um período de 14 dias sucessivos.

A dose inicial de 2000 mg/kg foi utilizada em virtude da existência de estudos com a *C. guianensis*, onde já se tem determinada a dose tóxica e a DL50 desse produto natural. Deste

modo, quando já se tem informação sobre a capacidade de mortalidade de alguma substância que seja improvável no mais alto nível da dose inicial, utiliza-se a dose máxima de 2000 mg/Kg.

O peso, por apresentar-se como um sinal de toxicidade, foi mensurado no dia 1, 7 e 14 de experimentação. Através deste acompanhamento observou-se que durante este período não houve perda significativa de peso, além de nenhuma redução na alimentação ou qualquer sinal de tristeza nos animais expostos ao extrato acetônico de *C. guianensis*, observou-se neste período uma evolução crescente no peso dos animais.

Tabela 3: Teste para confirmação da dose máxima de segurança biológica oral do extrato acetônico de *Carapa guianensis*.

Teste 1		
Dia	Controle	<i>C. guianensis</i> 2000mg/Kg
0	169,83 ± 27,23 n=3	229,20 ± 10,20 n=3
7	188,60 ± 25,45 n=3	247,85 ± 15,85 n=3
14	195,07 ± 22,05 n=3	254,40 ± 17,40 n=3

Média do peso corporal (Gramas ± Desvio Padrão) de ratos *Wistar* expostos oralmente ao veículo controle de diluição da droga (Salina 0,9% e Tween 80 1%) e o produto natural na dose de 2000 mg/Kg.

Tabela 4: Repetição do teste para confirmação da dose máxima de segurança do extrato acetônico de *Carapa guianensis*:

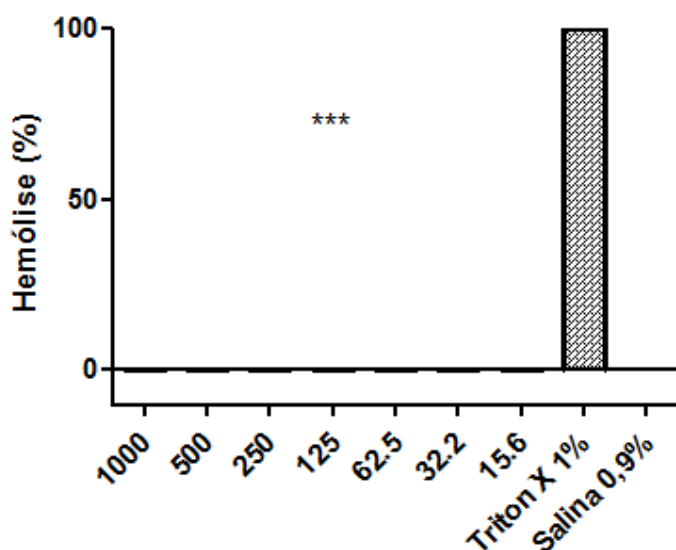
Teste 2		
Dia	Controle	<i>C. guianensis</i> 2000mg/Kg
0	160,15 ± 12,68 n=3	188,73 ± 5,66 n=3
7	169,83 ± 11,19 n=3	196,75 ± 14,51 n=3
14	179,03 ± 11,32 n=3	200,51 ± 14,50 n=3

Média do peso corporal (Gramas ± Desvio Padrão) de ratos *Wistar* expostos oralmente ao veículo controle de diluição da droga (Salina 0,9% e Tween 80 1%) e o produto natural na dose de 2000 mg/Kg.

7.3 Avaliação da atividade hemolítica

Os resultados obtidos da análise da atividade hemolítica dos animais submetidos ao tratamento com o extrato acetônico de *C. guianensis*, demonstraram que nenhuma das diferentes concentrações testadas (1000, 500, 250, 125, 62.5, 32.2, e 15,6 µg/ml, respectivamente) causou hemólise celular, sendo igual ao controle tratado com salina 0,9%, que diferem significativamente do controle com triton x. (Figura 7).

Figura 7. Análise da capacidade hemolítica do extrato acetônico de *C. guianensis*.



Nenhuma das concentrações utilizadas (1000, 500, 250, 125, 62.5, 32.2, 15.6 µg/ml, respectivamente) causou hemólise, resultado semelhante ao controle tratado com salina 0,9%, que possui diferença significativa do controle com triton x. (Figura 7). *** Representando que houve diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) (ANOVA, seguido do teste de Tukey).

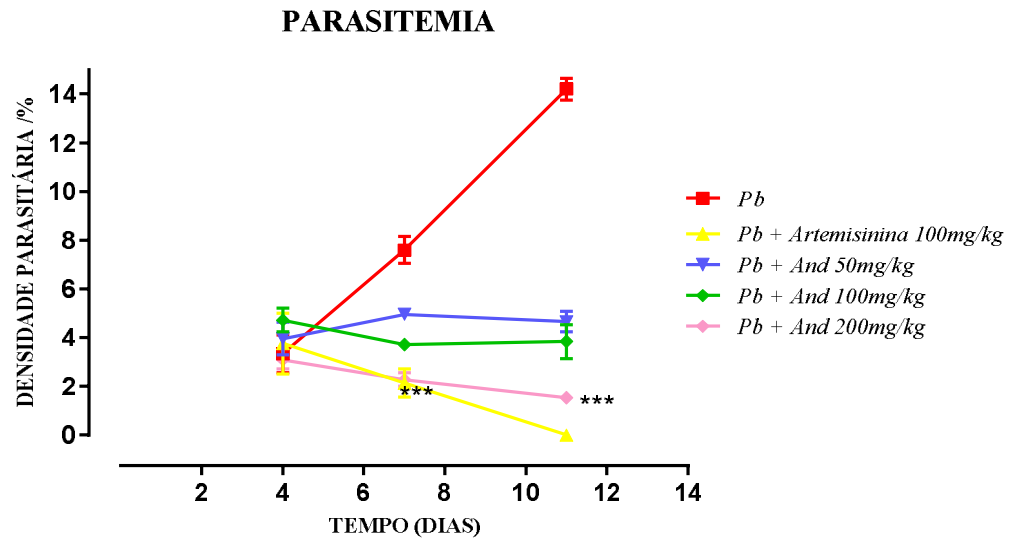
7.4 Avaliação da parasitemia

Após a análise quantitativa do número de parasitas nas amostras sanguíneas coletadas no 11º dia pós inoculação do sangue parasitado, o resultado demonstrou que o extrato acetônico de andiroba apresentou nas diferentes doses administradas (50, 100 e 200mg/kg), uma diminuição significativa da parasitemia sanguínea dos animais infectados pelo *P. berghei*. O tratamento padrão realizado com a artemisinina 100 mg/kg (Grupo 3) proporcionou aos animais uma supressão de 100 % dos parasitas. No tratamento com o extrato acetônico de andiroba a maior supressão de parasitemia nos camundongos BALB/c foi analisada na dose de 200 mg/kg apresentando maior eficácia na redução no número de

parasitas. Observou-se desta forma, que o percentual da parasitemia é diretamente proporcional ao aumento da dose do extrato acetônico de andiroba.

A análise quantitativa envolvendo o número de parasitas nas amostras sanguíneas coletadas de todos os grupos infectados pode ser observada na figura 8:

Figura 8. Evolução da Parasitemia dos camundongos BALB/c infectados com *Plasmodium berghei*.



Cada ponto representa a média \pm da densidade parasitária dos animais pertencentes aos grupos Pb (infectados com *P. berguei*), grupo Pb+Artemisinina 100mg/Kg/Dia, grupos Pb + And (Tratamento com o extrato acetônico da *C. guianensis* 50, 100 e 200mg/Kg/Dia respectivamente) N=06 número de animais por grupo. *** Representando que houve diferença significativa diferença ($p < 0,05$) na densidade parasitária do grupo *P. berghei* (Pb) quando comparado aos grupos Pb+Artemisinina 100mg, Pb+andiroba 50mg, Pb+andiroba 100mg e Pb+andiroba 200mg (ANOVA, seguido do teste de Tukey).

7.5 Avaliação do tempo de sobrevivência dos animais

Após a confirmação da infecção pelo *P. berghei* nos camundongos da linhagem BALB/c, observou-se a sobrevivência destes animais por meio da contagem de dias. Todos os grupos submetidos ao tratamento pertencentes aos grupos 4, 5 e 6 (Extrato acetônico de Andiroba 50, 100 e 200 mg/kg⁻¹dia), assim como os animais pertencentes ao grupo 3 (Padrao/Artemisinina 100 mg/kg) sobreviveram por um período superior a 4 semanas de observação, contabilizando um total de 30 dias. Enquanto que os animais pertencentes ao grupo 2 (PB/malária não tratada) permaneceram vivos por um período de no máximo 13º dias após a infecção.

Figura 9 - Tempo de sobrevivência dos camundongos BALB/c infectados com *Plasmodium berghei*.



Cada barra representa o tempo de sobrevivência (dias). Grupo 2 (PB/malaria não tratada), Grupo 3 (Pb+Artemisinina 100 mg/kg) Grupos 4, 5 e 6 (Pb + And 50, 100 e 200mg/Kg/Dia, respectivamente). *** Representa que teve uma diferença significativa $p < 0,001$ vs Grupo 2 (PB/malaria não tratada) (ANOVA, seguido pelo teste de Tukey).

7.6 Análise dos parâmetros hematológicos

7.6.1 Série vermelha

Os dados hematológicos da série vermelha estão apresentados na tabela 5. Após 7 dias de experimento houve uma diminuição significativa ($p < 0,001$) de hemácias no grupo 2 (malária/*P. berghei* não tratado) em comparação ao grupo 1 (controle/sem infecção). Além disso, o grupo 3 (Pb+Artemisinina 100mg) apresentou aumento significativo destas células ($p < 0,001$) quando comparamos com o grupo 2. Em relação aos grupos 5 e 6 (Pb+andiroba 100 e 200 mg/kg/dia, respectivamente) proporcionaram uma diferença significativa (** $p < 0,01$), enquanto que o grupo 4 (50 mg/kg/dia) não ofereceu diferença significativa deste parâmetro em comparação ao grupo 2. O número de hemácias dos grupos 3, 5 e 6, são semelhantes aos dos animais que não foram infectados com o *P. berghei* (Grupo 1).

Quando analisamos a concentração de hemoglobina no sétimo dia de infecção, observamos uma redução significativa deste parâmetro ($p < 0,001$) no grupo 2 em comparação ao grupo 1. Analisando os resultados do hematócrito e comparando o Grupo 2 com o Grupo 3 observamos que o tratamento proporciona um crescimento significativo ($p < 0,001$) nos valores de hemoglobina destes animais. Os grupos 5 e 6 ((Pb+andiroba 100 e 200 mg/kg/dia, respectivamente) proporcionaram uma diferença significativa (** $p < 0,01$) enquanto que o

grupo 4 (50 mg/kg/dia) não conseguiu proporcionar diferença significativa neste parâmetro quando comparamos ao grupo 2.

Ao compararmos o nível de hematócrito (Tabela 5) observamos uma redução significativa deste parâmetro ($p < 0,001$) do Grupo 2 em comparação direta ao grupo Grupo 1. Avaliando e comparado o resultado do grupo 2 e 3 percebemos que o tratamento gera um aumento significativo ($p < 0,001$) percentual de hematócrito destes animais. No que diz respeito ao grupo 6 (Pb+andiroba 200 mg/kg/dia) proporcionou uma diferença significativa (** $p < 0,01$), o grupo 5 (Pb+andiroba 100 mg/kg/dia) também apresentou diferença significativa (* $p < 0,05$), já o grupo 6 (50 mg/kg/dia) não obteve diferença significativa deste parâmetro quando comparados com Grupo 2.

Na avaliação do resultado da quantificação de Plaqueta (Tabela 5) analisamos uma diminuição significativa deste parâmetro ($p < 0,001$) do grupo 2 em comparação ao grupo 1. Ademais, o grupo 3 e 6 apresentaram o aumento significativo com $p < 0,001$, já o grupo 5 com $p < 0,05$ quando comparado com o grupo 2. O Grupo 4 não conseguiu proporcionar diferença significativa deste parâmetro comparado ao grupo 2.

Tabela 5: Análise hematológica dos grupos experimentais tratados com o extrato acetônico de *Carapa guianensis* e artemisinina no 11º dia após a infecção por *Plasmodium berghei* em camundongos BALB/c.

	<i>Número de eritrócitos</i> 10 ⁶ /µl	Hemoglobina g/dL	Hematócrito %	Plaquetas 10 ⁶ /µl
Grupo 1 (Controle)	9,18±0,47	14,06±1,20	48,7±1,14	732±23,2
Grupo 2 (PB)	3,12±0,62####	6,11±0,98####	20,45±3,51####	236±37,03####
Grupo 3 (PB+Artemi 100mg)	10,02±2,01***	13,58±2,52***	48,02±8,7***	813±32,41***
Grupo 4 (PB+And 50mg)	3,2±0,35	14,70±0,42	22,36±3,06	351±72,05
Grupo 5 (PB+And 100mg)	7,20±2,63**	11,78±2,53**	38,2±10,41*	437±51,94*
Grupo 6 (PB+And 200mg)	8,06±2,415**	6,82±0,79**	42,06±13,1**	610±85***

Análise hematológica dos animais tratados com o extrato acetônico de *Carapa guianensis* e artemisinina no 11º dia após a infecção por *P. berghei* em camundongos BALB/c.* P.b: *Plasmodium berghei*. Média ± SEM. Grupo 1 (controle), Grupo 2 (PB/malária não tratada); Grupo 3 (PB+artemisinina 100 mg kg⁻¹dia); Grupos 4, 5 e 6 (PB+And 50, 100 e 200mg 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).

7.6.2 Série branca: Contagem global de leucócitos

Como apresentado tabela 6, a análise da contagem global do número de leucócitos, linfócitos, monócitos e neutrófilos segmentados obteve um aumento significativo (p <0,001) no Grupo 2 (infecção pelo *P. berghei* sem tratamento) quando comparamos ao Grupo 1 (sem infecção). Todos os grupos tratados 3, 4, 5 e 6, demonstraram uma diminuição significativa (p < 0,001) nesses valores quando comparados ao grupo 2.

Tabela 6: Análise dos parâmetros hematológica da série branca (leucócitos) dos grupos experimentais tratados com o extrato acetônico de *Carapa guianensis* e artemisinina no 11º dia após a infecção por *Plasmodium berghei* em camundongos BALB/c.

	Número total de leucócitos 10⁶/µl	Linfócitos 10⁶/µl	Monócitos 10⁶/µl	Neutrófilos segmentados 10⁶/µl
Grupo 1 (Controle)	4,30±0,78	2,43±0,64	0,53±0,10	2,165±1,16
Grupo 2 (PB)	151,6±8,43####	87,47±2,88####	5,22±0,72####	23,12±6,27####
Grupo 3 (PB+Artemi 100mg)	6,19±0,31***	3,52±0,42***	0,59±0,09***	1,63±0,36***
Grupo 4 (PB+And 50mg)	12,75±1,32***	8,25±10,23 ***	0,85±0,05***	2,±0,86***
Grupo 5 (PB+And 100mg)	10,22±1,37***	6,763±0,32***	0,68±0,02***	1,73±0,52***
Grupo 6 (PB+And 200mg)	8,08±3,413***	5,41±0,88***	0,37±0,09***	1,62±0,57***

* *P.b.*: *Plasmodium berghei*. Média ± SEM. Grupo 1 (controle), Grupo 2 (PB/malária não tratada); Grupo 3 (PB+artemisinina 100 mg kg⁻¹ dia); Grupos 4, 5 e 6 (PB+And 50, 100 e 200 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).

8. DISCUSSÃO

Baseado em dados etnofarmacológicos sobre a *C. guianensis* descritos na literatura, observamos que esta espécie tem sido utilizada no tratamento de várias doenças parasitárias, incluindo a malária. Considerando o grande potencial farmacológico dos produtos naturais provenientes de metabólitos secundários das plantas, o presente estudo avaliou a atividade antimalárica do extrato acetônico do resíduo industrial de *C. guianensis* (andiroba).

Nos bancos de dados consultados até o presente momento, não encontramos nenhum estudo referente à atividade antimalárica *in vivo* do extrato acetônico do resíduo industrial de *C. guianensis*. Os estudos farmacológicos por outras pesquisas, determinam atividades anti-sépticas (BRASIL, 2021), antiparasíticas (JESUS *et al.*, 2017), cicatrizantes (MORAES *et al.*, 2019), anti-helmínticas (AMORIM *et al.*, 2020) e anti-inflamatórias (SOUSA *et al.*, 2019). A *C. guianensis* também é usada por comunidades indígenas no tratamento de tosse, convulsões, doenças de pele, artrite, reumatismo, infecções de ouvido e como repelente de insetos (COSTA-SILVA *et al.*, 2007). As folhas de *C. guianensis* são utilizadas no tratamento de úlceras e parasitas da pele (NAYAK *et al.*, 2009). Além de ser utilizada no tratamento da malária entre as populações rurais e ribeirinhas de acordo com Oliveira *et al.* (2014).

A caracterização química desta espécie em conjunto com a avaliação da atividade antimalárica e sua toxicidade, são importantes para validar suas propriedades farmacológicas. A composição fitoquímica de *C. guianensis*, baseia-se na presença de limonoides como compostos majoritários, sendo eles: methyl angolensate, 6 α -acetoxygedunin, gedunin, 7-deacetoxy-7-oxogedunin, xylocensin K, andirobin e deacetylgedunin, responsáveis pela ação terapêutica da espécie (PERON, 2017).

Para se avaliar a toxicidade da andiroba, foram realizados testes de toxicidade aguda que são importantes e indispensáveis para se analisar a atividade biológica de produtos de origem vegetal, tendo em vista que muitos produtos naturais podem desencadear efeitos adversos e até letais (SONAGLIO *et al.*, 2003). Nos testes de toxicidade realizados com o extrato acetônico de *Carapa guianensis* foi evidenciado que a dose tóxica aguda é superior a 2000 mg/kg em camundongos BALB/c, sendo classificada como categoria 5 do *Globally Harmonized Classification System* (GHS), segundo o critério do protocolo experimental adotado. Os resultados obtidos através dos testes de toxicidade foram utilizados como base para se determinar as doses seguras para serem utilizadas no teste antimalárico *in vivo*.

A toxicidade aguda de compostos em experimentação é analisada a partir da observação de sinais como alterações no peso, na pelagem, nos olhos, nas mucosas e no comportamento. A alteração imediata mais manifestada em relação a ação tóxica é a redução do peso do animal (LEMOS *et al.*, 2018). Durante os testes realizados o extrato acetônico de *C. guianensis*, apresentou baixa toxicidade, não sendo evidenciado nenhum sinal ou sintoma de toxicidade ou morte nos animais, podendo então, desta forma ser administrado com segurança nas doses que foram testadas.

Em um estudo realizado por JÚNIOR *et al.*, (2012), os resultados demonstraram que o óleo da *C. guianensis* não apresentam toxicidade em ratos. Assim como, a pesquisa realizada por COSTA-SILVA *et al.*, (2007) que avaliou o óleo da semente de *C. guianensis* para toxicidade aguda e subaguda por via oral em ratos Wistar e como resultado o teste de toxicidade aguda não produziu quaisquer sinais ou sintomas de toxicidade ou ocorrência de mortes. O tratamento subagudo também não alterou o peso, consumo de alimentos e água dos animais. Análises hematológicas realizadas não apresentaram diferenças significativas em nenhum dos parâmetros analisados. Em conclusão, a administração aguda e subaguda do óleo da semente de *C. guianensis* não produziu efeitos tóxicos em ratos Wistar machos.

Quando avaliamos o resultado da atividade hemolítica dos animais submetidos ao tratamento com o extrato acetônico de *C. guianensis*, evidenciou-se que nenhuma das diferentes concentrações testadas ocasionam hemólise das células. A avaliação da hemólise é um dos testes utilizados para evidenciar a citotoxicidade de plantas. De acordo com Paula *et al.*, (2014), hemólise é a lise ou ruptura das membranas das hemácias, responsáveis pela liberação da hemoglobina para o plasma, tendo como resultado a hemoglobinemia, desencadeando problemas como hemoglobinúria. Desta forma, esse teste é utilizado nas pesquisas de citotoxicidade de plantas medicinais, sendo efetivo como estudo preliminar de compostos com potenciais bioativos.

A atividade antimalárica de *C. guianensis*, foi testada utilizando camundongos BALB/c infectados com o *P. berghei*. O extrato acetônico da andiroba provocou uma redução significativa da parasitemia nas doses testadas *in vivo*, evidenciando o controle sobre a evolução dos níveis parasitêmicos dos animais infectados. A maior supressão da parasitemia nos camundongos BALB/c foi evidenciado na dose de 200 mg/kg, apresentando maior eficácia. Desta forma, ressalta-se que a redução da parasitemia é diretamente proporcional ao aumento da dose do extrato acetônico de andiroba. Após sete

dias de infecção e tratamento, evidenciou-se que a eficácia terapêutica da andiroba é parecida com o resultado obtido da droga padrão.

Nosso resultado corrobora com os achados de PEREIRA *et al.*, (2014) onde evidenciou que os limonóides isolados do óleo de andiroba reduz a parasitemia na malária em camundongos BALB/c infectados com a cepa *P. berghei* NK65 sensível à cloroquina no teste supressivo de 4 dias. Neste estudo, as doses testadas suprimiram a parasitemia em 40 e 66%, respectivamente, comprovando uma clara resposta à dose.

Avaliamos também o tempo de sobrevivência dos animais após a confirmação da infecção pelo *P. berghei* submetidos ao tratamento com o extrato acetônico de *C. guianensis*, observou-se a sobrevivência dos animais por meio da contagem de dias que permaneciam vivos após a sua infecção. Os resultados obtidos demonstraram que todos os grupos submetidos ao tratamento com *C. guianensis*, assim como o grupo tratado com a droga padrão sobreviveram por um período superior a 4 semanas de observação, contabilizando um total de 30 dias. Já os animais pertencentes ao grupo infectados pelo *P. berghei* que não receberam qualquer tipo de tratamento permaneceram vivos por um período de no máximo 13^o dias após a infecção.

O aumento significativo no tempo de sobrevivência dos animais pós tratamento, pode estar diretamente ligado a um possível efeito terapêutico do extrato acetônico de *C. guianensis* sobre a diminuição dos níveis de parasitemia. Haja vista que a ação terapêutica do extrato acetônico de andiroba proporcionou aos camundongos tratados uma sobrevivência durante todo o período de análise do estudo. No que diz respeito a sobrevivência dos animais infectados que não receberam qualquer tratamento foi de em média 13 dias, resultado semelhante ao descrito no estudo de Somsak *et al.*, (2015).

São várias as alterações fisiopatológicas desencadeadas pela infecção do *P. berghei*, essas alterações são causadas por múltiplos fatores que englobam uma complexa relação entre o hospedeiro e o parasita, desta forma, o estudo das inúmeras alterações hematológicas desenvolvidas pela malária foi analisada em nossa pesquisa, assim como, evidenciamos o quadro clínico da infecção e demonstramos a ação terapêutica do tratamento realizado.

Dentre as alterações fisiopatológicas, a anemia, apresenta-se como um fator determinante do grau de severidade da doença, sendo classificada como uma complicação clínica letal, desencadeada pela destruição dos eritrócitos, podendo ser identificada na infecção de camundongos com o *P. berghei*. A anemia, leucocitose, eosinopenia e trombocitopenia são complicações hematológicas ocasionadas por essa infecção. Dentro dos

glóbulos vermelhos as formas sexuadas do parasita ocasionam a lise das hemácias, ocorrendo uma diminuição de hemoglobina o que acarreta em anemia grave (ASANGA *et al.*, 2017).

Em nosso estudo quando avaliamos o resultado da análise hematológica dos parâmetros da série vermelha, observamos que houve uma diminuição de RBC, HTC e HGB dos animais infectados e não tratados (grupo 2). Resultado parecido ao observado na pesquisa de Souza *et al.*, (2018) e Ballal *et al.*, (2011) onde demonstraram que houve uma diminuição da série vermelha dos animais infectados pelo *P. berghei* e que não foram submetido a qualquer tipo de tratamento. Logo, nosso resultado demonstra semelhança aos estudos presentes na literatura em modelos de estudo que utilizam a infecção pelo *P. berghei*.

Quando avaliamos o resultado do grupo 3, submetido ao tratamento com a droga padrão usada para tratar a malária, obtivemos uma diferença significativa quando comparado ao grupo 2 (malária), apresentando um importante aumento de RBC, HTC E HGB. A reversão deste parâmetro presente no grupo 3, confirmou a importância de se realizar estudos que reproduzam a complexa relação parasita-hospedeiro em modelos experimentais, tornando-se indispensáveis para se avaliar os efeitos desencadeados pela droga teste nesses parâmetros (MIZOBUCHI *et al.*, 2014).

Ao analisarmos os resultados da série vermelha, observou-se um aumento significativo de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito nos grupos 5 e 6 submetidos ao tratamento com *C. guianensis*, quando comparado ao grupo 2 (malária). O grupo 3 tratado com artemisinina também apresentou aumento deste parâmetro quando comparamos ao resultado apresentado pelo grupo 2.

Grande parte da mortalidade apresentada pela malária é atribuída a gravidade da anemia, ocasionada pela lise dos eritrócitos (VENTURA, 2010). Esta anemia também pode ser evidenciada na infecção pelo *P. berghei* em camundongos. Os resultados apresentados pelo tratamento com o extrato acetônico de *C. guianensis* foi eficaz e desencadeou um aumento nos parâmetros hematológicos dos animais testados. A redução da hemólise celular foi promovida pela diminuição da parasitemia nos grupos submetidos ao teste com *C. guianensis*, estando diretamente ligado ao aumento de RBC, HTC e HGB, revertendo a anemia apresentado pela malária.

Na análise do parâmetro hematológico da série branca (leucograma), evidenciou-se uma diminuição do número de leucócitos dos grupos submetidos ao tratamento com o extrato acetônico de *C. guianensis* em relação ao grupo 2. O grupo 3 também apresentou redução neste padrão quando comparado ao grupo 2. O quadro infeccioso causado pelo *P. berghei*

promove um aumento significativo sobre o perfil de leucócitos presentes na corrente sanguínea dos animais analisados, sendo visível no grupo 2.

Avaliando o resultado do aumento do parâmetro WBC após a infecção pelo *P. berghei* no grupo 2, evidencia-se a tentativa do sistema imunológico em combater o agente infeccioso do organismo. Segundo Lacerda-Queiroz *et al.*, (2012) este aumento de WBC no organismo é a resposta do hospedeiro infectados por *P. berghei*.

No organismo o sistema imunológico é o responsável por combater o parasita, a produção de células do sistema imune são essenciais na destruição do parasita. Estudos apontam, que nos mecanismos imunológicos envolvidos na infecção pelo *Plasmodium*, o sistema imunológico do hospedeiro desenvolve uma resposta contra o parasita, que altera todos os componentes do sistema imune. Em um estudo realizado por Oliveira (2010) encontrou valores médios abaixo da normalidade para a contagem de leucócitos, linfócitos e plaquetas, sendo justificada pela provável redistribuição dos leucócitos para locais com processos inflamatórios ativos. Enquanto que, o número de bastões teve a média acima dos níveis normais, o que sugere que há uma maior utilização de neutrófilos do que a capacidade do organismo de produzi-los e maturá-los.

9. CONCLUSÃO

As informações etnofarmacológicas sobre as plantas medicinais são importantes na busca por novos compostos biologicamente ativos. Nesta pesquisa o extrato acetônico de *C. guianensis* obtido a partir do resíduo industrial de uma empresa de Ananideua-PA, foi submetido a testes *in vivo* para se avaliar a atividade antimalárica desta espécie.

Como resultado, o extrato acetônico de *C. guianensis* demonstrou um efeito significativo na supressão da parasitemia de camundongos BALB/c infectados com *P. berghei* em diferentes doses testadas, assim como, não apresentou toxicidade aguda *in vivo* na dose máxima de 2.000 mg/kg, testada conforme o protocolo seguido. Além de ter demonstrado um resultado positivo na análise de sobrevivência dos animais infectados e tratados com diferentes doses (50, 100 e 200mg/kg) de *C. guianensis*.

Desta forma, conclui-se que o extrato acetônico de *C. guianensis* possui um potencial efeito antimalárico e necessita de estudos posteriores que corroborem com esses resultados, possibilitando o desenvolvimento de um novo fármaco como alternativa no tratamento da malária.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHAN, J. TALISUNA, A.O. ERHART, A. YEKA, A. TIBENDERANA, J.K. BALIRAINÉ, F.N. ROSENTHAL, P.J. D'ALESSANDRO, U. Quinine, an old antimalarial drug in a modern world: role in the treatment of malaria. *Malaria Journal*, 10:144, 2011.

AGUIAR, A. P. S. Doença Renal na Malária. Tese de mestrado integrado em medicina. Faculdade de Medicina. Universidade do Porto. *Acta Médica Portuguesa*. Abril, 2010.

AGUIAR, A. C. C. ROCHA, E. M. D. SOUZA, N. B. D. FRANÇA, T. C. KRETTLI, A. U. New approaches in antimalarial drug discovery and development: a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 107, p. 831-845, 2012.

AMORIM, S. L. DA SILVA, L. B. BARATA, J. S. PEREIRA, M. A. F. M. DE OLIVEIRA, A. C. P. ATHAYDE, A. C. R. Prospecção fitoquímica da *Carapa guianensis* (Meliaceae) e *Uncaria guianensis* (Rubiaceae) com vista á atividade anti-helmíntica sobre nematódeos gastrintestinais de pequenos ruminantes. *Scientia Naturalis*, 2(1). <https://periodicos.ufac.br/index.php/SciNat/article/view/3585>, 2020.

AMORIM, S. L. DA SILVA, L. B. BARATA, J. S. PEREIRA, M. A. F. M. DE OLIVEIRA, A. C. P. ATHAYDE, A. C. R. Prospecção fitoquímica da *Carapa guianensis* (Meliaceae) e *Uncaria guianensis* (Rubiaceae) com vista a atividade anti-helmíntica sobre nematódeos gastrintestinais de pequenos ruminantes. *Scientia Naturalis*, 2 (1). <https://periodicos.ufac.br/index.php/SciNat/article/view/3585>, 2020.

ANTINORI, S. GALIMBERT, L. MILAZZO, L. CORBELLINO, M. Biology of Human Malaria Plasmodia Including *Plasmodium knowlesi*. *Mediterr J Hematol Infect Dis*, 4(1): e2012013, 2012.

ARAÚJO-LIMA, C. F. FERNANDES, A. S. GOMES, E. M. OLIVEIRA, L. G. MACEDO, A. F. ANTONIASSI, R. WILHELM, A.E. AIUB, C.F. FELZENSZWALB, I. Antioxidant Activity and Genotoxic Assessment of Crabwood (*Andiroba*, *Carapa guianensis* Aublet) Seed Oils. *Oxidative medicine and cellular longevity*, v. 2018, p. 1-11, 2018.

ASANGA, E.E. IGILE, G.O. ALWARA, I.A. EBONG, P.E. ESEYIN, O.A. 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.

BAHETI, R. LADDHA, P. GEHLOT, R.S. Liver involvement in falciparum malária – A histo-pathological analysis. *J Indian Acad Clin Med*;4(1):34-8, 2003.

BALLAL, A. BOBBALA, D. QADRI, S.M. FOLLER, M. KEMPE, D. NASIR, O. SAEED, A. LANG, F. Anti-malarial effect of gum arabic. *Malaria Journal*, v. 10, n. BioMed Central, p. 139, 2011.

BARREIRO, E. J. BOLZANI, V. S. Biodiversidade: Fonte potencial para descoberta de novos fármacos. *Química Nova*. 680, 2009.

BARREIRO, E. J. FRAGA, C. A. M. *Química Nova* 1999, 22, 744; Costa, P. R. R.; *Quim. Nova*, 25, 74, 2002.

BASIR, R. RAHIMAN, S.S.F. HASBALLAH, K. CHONG, W.C. TALIB, H. YAM, M.F. JABBARZARE, M. TIE, T.H. OTHMAN, F. MOKLAS, M.A.M. ABDULLAH, W.O. AHMAD, Z. *Plasmodium berghei ANKA Infection in ICR Mice as a Model of Cerebral Malaria. Iranian J. Parasitol: Vol. 7, No.4, , pp. 62-74, 2012.*

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação e Insumos Estratégicos em Saúde. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. *Informações Sistematizadas da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS : Carapa guianensis Aubl. Meliaceae – Andiroba [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação e Insumos Estratégicos em Saúde, Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. – Brasília : Ministério da Saúde, 2021.*

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. *Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso – 4. ed. ampl.– Brasília: Ministério da Saúde, 2004.*

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. *Ações de controle da malária: manual para profissionais de saúde na atenção básica. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde. 52 p.: il. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos), 2006.*

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. *Guia prático de tratamento da malária no Brasil. – Brasília : Ministério da Saúde, 2010.*

BRASIL. Ministério da Saúde. *Informações Sistematizadas da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS: Carapa guianensis Aubl. Meliaceae – Andiroba. Brasília, Ministério da Saúde, 2021.*

BRASIL, *Manual de Terapêutica da Malária / Colaboração de Agostinho Cruz Marques [et al]. Brasília: Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde, 2001.*

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação e Insumos Estratégicos em Saúde. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. *Informações Sistematizadas da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS : Carapa guianensis Aubl. Meliaceae – Andiroba [recurso eletrônico] Brasília : Ministério da Saúde, 2021.*

BRAGA, E.M. FONTES, C.J.F. *Plasmodium – Malária. In: NEVES, D. P. Parasitologia Humana. 10 ed. São Paulo: Atheneu, pp. 128–146, 2000.*

COSTA, A. D. P. BRESSAN, C.S. PEDRO, R.S. VALLS-DE-SOUZA, R. SILVA, S.D. SOUZA, P.R. GUARALDO, L. FERREIRA, M. F.C. RIBEIRO, D. C.T. BRASIL, P. *Delayed diagnosis of malaria in a dengue endemic area in the Brazilian extra-Amazon: recent*

experience of a malaria surveillance unit in state of Rio de Janeiro. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 43, n. 5, p. 571– 574, 2010.

COSTA, G. L. Variação de Numero de Copias em Genes Relacionados a Resistencia aos Antimaláricos em Isolados de *Plasmodium* spp. do Brasil / Gabriel Luiz Costa. – Belo Horizonte, 2017.

COSTA-SILVA, J. H. LIMA, C. R. SILVA, E. J. R. ARAÚJO, A. V. FRAGA, M. C. C. A. E RIBEIRO, A. R. WANDERLEY, A. G. Acute and subacute toxicity of the *Carapa guianensis* Aublet (Meliaceae) seed oil. *Journal of ethnopharmacology*, 116(3), 495-500, 2008.

CHAVES, T.S.S. MACHADO, R. L. D. VENTURA, A. M. R. Vacina contra a malaria. *Revista de Imunizações*. V.8, N.4, 2015.

CONFALONIERI, U.E.C. Saúde na Amazônia: um modelo conceitual para a análise de paisagens e doenças. *Dossiê Amazonia Brasileira I. Estudos Avançados* ;19(53):221-236.v, 2005.

CORDEIRO, C.E.S. FILOMENO, C.R. COSTA, C.M.A. COUTO, A.A.R.D. Perfil epidemiológico da malária no Estado do Pará em 1999 com base numa série histórica de dez anos (1989-1999). *Informe Epidemiológico do SUS*;11(2):69-77, 2002.

DAVIS, T.M. HO, M. SUPANARANOND, W. LOOAREESUWAN, S. PUKRITTAYAKAMEE, S. WHITE, N. J. Changes in the peripheral blood eosinophil count in falciparum malaria. *Acta Trop.* 1991 Jan;48(3):243-6, 1991.

DA SILVA, V. P. OLIVEIRA, R. R. FIGUEIREDO, M.R. Isolation of limonoids from seeds of *Carapa guianensis* Aublet (Meliaceae) by high-speed countercurrent chromatography. *Phytochemical Analysis*, v. 20, n. 1, p. 77-81, 2009.

DA SILVA, F. R. P. ALMEIDA, S.S.M.S. Análise fitoquímica e microbiológica da atividade do extrato bruto etanólico da Andiroba, *Carapa guianensis* Aubl. *Biota Amazônia (Biote Amazonie, Biota Amazonia, Amazonian Biota)*, v. 4, n. 4, p. 10-14, 2014.

DESHPANDE, S. KUPPAST, B. 4-aminoquinolines: An Overview of Antimalarial Chemotherapy. *Medicinal Chemistry* 6: 001-011, 2016.

DE DONNO. A. GRASSI, T. IDOLO, A. GUIDO, M. PAPADIA, P. CACCIOPPOLA, A. VILLANOVA, L. MERENDINO, A. BAGORDO, F. FANIZZI, F. P. First-time comparison of the in vitro antimalarial activity of *Artemisia annua* herbal tea and artemisinin. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 106, 696-700, 2012.

DOOLAN, D.L. DOBAÑO, C. BAIRD J.K. Acquired immunity to malaria. *Clinical Microbiology Reviews*. Jan;22(1):13-36, Table of Contents, 2009.

DIAS, L. R. S. FREITAS, A. C. C. Malária: uma revisão. *Biociência/Bio-science:Revista Científica do CCM*, v. 9, p. 39-44, 1997.

FRASSON, A. P. BARLETTE, A. G. DALPIZOLO, C. SAUTER, I. P. MACEDO, A. J. TASCA, T. Estratégias e desafios no combate à malária. Revista Liberato, Novo Hamburgo, v.10, n.14, p, 201-208, jul/dez, 2009.

FRANÇA. T. C. C, SANTOS. M. G, VILLAR. J. D. F. Malária: aspectos históricos e quimioterapia. Quim. Nova 31, 1271-1278, 2008.

FUNASA – Fundação Nacional de Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica. 5 ed. Brasília: Ministério da Saúde, 559p, 2002.

GARCIA, L. S. Malaria. Clinics in Laboratory Medicine, v. 30, n. 1, p. 93-129, 2010.

GLÓRIA, J.C. ALMEIDA, M. E. M. ALVES, K. C. S. ARAÚJO, F. ÁVILA, R. A. M. NOGUEIRA, P. A. MARIÚBA, L. A. M Métodos para diagnóstico de Malária: Atualização e desafios. Scientia Amazonia, v. 7, n.2, B24-B31, 2018.

GOMES, A. P. VITORINO, R.R. COSTA, A.P. MENDONÇA, E.G. OLIVEIRA, M. G. A. OLIVEIRA, BATISTA, R.S. Malária grave por *Plasmodium falciparum*. Rev Bras Ter Intensiva; 23(3):358-369, 2011.

GREENWOOD, B. M. FIDOCK, D. A. KYLE, D. E. COLLINS, F. H. DUFFY, P. E. ALONSO, P. L. Malaria: progress, perils, and prospects for eradication. The Journal of Clinical Investigation, 1266-1273, 2008.

GOMES, A.P. VITORINO, R.R. COSTA, A.P. MENDONÇA, E.G. OLIVEIRA, M.G.A. BATISTA, R.S. Malária grave por *Plasmodium falciparum*. Revista Brasileira de Terapia Intensiva; 23(3):358-369, 2011.

GRYZLO, B. KULIG, K. Quinoline – a Promising Fragment in the Search for New Antimalarials. Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, v. 14, p. 332-344, 2014.

HALDAR, K.; MOHANDAS, N. Malaria, erythrocytic infection, and anemia. Hematology Am Soc Hematol Educ Program:87-93. Review, 2009.

HANSCHIED T. LANGIN, M. LELL, B. POTSCHEKE, M. OYAKHIROME, S. KREMSNER, P. GROBUSCH, M.P. Full blood count and haemozoin-containing leukocytes in children with malaria: diagnostic value and association with disease severity. Malar J;7:109, 2008.

HSU. E. The history of qing hao in the Chinese materia medica. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 100 505-508, 2006.

JAMBOU, R.M.D. LEGRAND, E. NIANG, M. KHIM, M. LIM, P. VOLNEY, B. EKALA, M. T. BOUCHIER, C. ESTERRE, P. FANDEUR, T. MERCEREAU-PUIIALON, O. Resistance of *Plasmodium falciparum* field isolates to in-vitro artemether and point mutations of the SERCA-type PfATPase6. The Lancet, Volume 366, Issue 9501, 3–9 December, Pages 1908-1909, 2005.

JESUS, F. L. DE ALMEIDA, F. B. DUARTE, J. L. OLIVEIRA, A. E. CRUZ, R. A. SOUTO, R. N. FERNANDES, C. P. Preparation of a nanoemulsion with *Carapa guianensis* Aubl et (Meliaceae) oil by a low-energy/solvent-free method and evaluation of its preliminary residual larvicidal activity. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. <https://www.hindawi.com/journals/ecam/2017/6756793/>, 2017.

JUNQUEIRA, M. I. Immunomodulatory therapy associated to antiparasite drugs as a way to prevent severe forms of malaria. *Current Clinical Pharmacology*, Hoboken, v. 1, p. 59-73, jan. 2007.

KANNAN, R. KUMAR, K. SAHAL, D. KUKRETI, S. CHAUHAN, V.S. Reaction of artemisinin with haemoglobin: implications for antimalarial activity. *Biochemical Journal*, v. 385, p. 409418, 2005.

KLIMAS, C.A. KAINER, K.A. WADT, L.H.W. "Population structure of *Carapa guianensis* in two forest types in the southwestern Brazilian Amazon." *Forest Ecology and Management* 250.3: 256-265, 2007.

KOOGAN, R. L. *Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais*. 4 ed, Rio de Janeiro, Guanabara, 2009.

LACERDA-QUEIROZ, N. RODRIGUES, D.H. VILELA, M.C. RACHID, M.A. SORIANI, F.M. SOUSA, L.P. CAMPOS, R.D.L. QUESNIAUX, V.F.J. TEIXEIRA, M.M. TEIXEIRA, A.L. 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.

LAPOUBLE, O.M.M. SANTELLI, A.C.F.S. MUNIZ-JUNQUEIRA, M.I. Situação epidemiológica da malária na região amazônica brasileira, 2003 a 2012. *Rev Panam Salud Publica*.,38(4):300-6, 2015.

LA-SCALEA, M. A. FERREIRA, E. I. SILVA, H. S. R. C. Redução voltamétrica de artemisinina e sua interação com grupo heme(hemina). *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 372, 373, 2007.

LASERSON, K.F. PETRALANDA, I. HAMLIN, D.M. ALMERA, R. FUENTES, M. CARRASQUEL, A. BARKER, J.R.H. Use of the polymerase chain reaction to directly detect malaria parasites in blood samples from the Venezuelan Amazon. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 50:169-180, 1994.

LAHLOU, M. The success of natural products in drug discovery. *Pharmacology e Pharmacy*, v. 4, p. 17-31, 2013.

LEITE, F. H. A. FONSECA, A. L. NUNES, R.R. JUNIOR, M.C. VAROTTI, F.P. TARANTO, A.G. Malária: Dos velhos fármacos aos novos alvos moleculares. *BBR - Biochemistry And Biotechnology Reports Jul./Dez.*, v.2, n.4, p. 59-76, 2013.

LEMOS, D. C. S. SILVA, B.C. SOUZA, J.M. SILVA, W.A.M. ESTRELA, D.C. OLIVEIRA, R.F. GUIMARÃES, A.T.B. MALAFAIA, G. Toxicidade aguda em camundongos BALB/c expostos a efluentes de curtume. *Multi-Science Journal*, v. 1, p. 2359-6902, 2018.

MACIEL, F. O. SILVA, R. B. L. SOUTO, R.N.P. Fatores de riscos associados à transmissão de malária humana, em áreas de ressacas, nos bairros Novo Horizonte e Zerão, Macapá, Amapá, Brasil. *Biota Amazônia*. Macapá, v. 1, n. 1, p. 63-73, 2011.

MANGOLD, K.A. MANSON, R.U. KOAY, E.S.C. STEPHENS, L. REGNER, M. THOMSON, R.B. PETERSON, L.R. KAUL, K.L Real-time PCR for detection and identification of *Plasmodium* spp. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 43, n. 5, p. 2435–2440, 2005.

MORAES, L. L. C. FREITAS, J. L. FILHO, J. R. M. LIMA, R. B., BORGES, C. H. A. DOS SANTOS, A. C. A Ethno-knowledge of medicinal plants in a community in the eastern Amazon. *Revista de Ciências Agrárias*, 42(2), 565-573. <https://revistas.rcaap.pt/rca/article/view/15625>, 2019.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde Departamento de Imunizações e Doenças Transmissíveis. Coordenação-Geral de Vigilância de Zoonoses e Doenças de Transmissão Vetorial. 1ª edição, versão eletrônica, 2019.

MIZOBUCHI, H. YAMAKOSHI, S. OMACHI, S. OSADA, Y. SANJOBA, C. GOTO, Y. MATSUMOTO, Y. 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.

MIRANDA JÚNIOR, R. N. C. M. Atividade antiplasmódica e toxicidade dos óleos de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) e pimenta-de-macaco (*Piper aduncum* L) em Murinos. Tese (Doutorado em Biologia dos Agentes Infecciosos e Parasitários) - Universidade Federal do Pará, Belém, 2014.

MIRANDA JÚNIOR, R. N. C. DOLABELA, M. F. SILVA, M. N. POVOA, M. M. MAIA, J. G. S. Antiplasmodial activity of the andiroba (*Carapa guianensis* Aubl., Meliaceae) oil and its limonoid-rich fraction. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 142, n. 3, p. 679–683, 2012.

MIOTO, L.D. GALHARDI, L. C. F. AMARANTE, M. K. Aspectos parasitológicos e imunológicos da malária. Departamento de Ciências Patológicas, Universidade Estadual de Londrina, Biosáude, Londrina, 2012.

MOODY, A. Rapid diagnostic tests for malaria parasites. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 15, n. 1, p. 66–78, 2002.

MOORTHY, V.S. GOOD, M.F. HILL, A.V. Malaria Vaccine Developments [Desenvolvimentos da vacina contra a malária]. *The Lancet*.; 363:150-155, 2004.

MURPHY, S. C. SHOTT, J.P. PARIKH, S. ETTER, P. PRESCOTT, W.R. STEWART, V.A. Malaria diagnostics in clinical trials. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 89, n. 5, p. 824–39, 2013.

NASCIMENTO, G. O. SOUZA, D. P. SANTOS, A. S. BATISTA, J. F. RATHINASABAPATHI, B. GAGLIARDI, P. R. GONÇALVES, J. F. C. Lipidomic profiles from seed oil of *Carapa guianensis* Aubl. And *Carapa vasquezii* Kenfack and implications for the control of phytopathogenic fungi. *Industrial Crops and Products*, 129, 67-73. doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.11.069, 2019.

NAYAK, B. S. KANHAI, J. MILNE, D. M. SWANSTON, W. H. MAYERS, S. EVERSLEY, M. RAO, A.V.C. Investigation of the wound healing activity of *Carapa guianensis* L. (meliaceae) bark extract in rats using excision, incision, and dead space wound models. *Journal of Medicinal Food*, v. 13, n. 5, p. 1141–1146, 2010.

NITCHEU, J. BONDUELLE, O. COMBADIÈRE, C. TEFIT, M. SEILHEAN, D. MAZIER, D. COMBADIÈRE, B. Perforin-Dependent Brain-Infiltrating Cytotoxic CD8* Lymphocyte Mediate Experimental Cerebral Malaria Pathogenesis. *J Immunol*; 170.2221-2228, 2003.

NOGUEIRA, F. ROSARIO, V. E. Métodos para avaliação da atividade antimalárica nas diferentes fases do ciclo de vida do Plasmodium. *Rev Pan-Amaz Saude*; 1(3):109-124, 2010.

NONATO, O. DOMINGOS, S. C. SOUZA, S. AMORIM, S. MEDEIROS, L. Identificando Os Usos Terapêuticos Da *Carapa Guianensis*. *Enciclopédia Biosfera*, 15(28).<https://conhecer.org.br/ojs/index.php/biosfera/article/view/466/439>, 2018.

OLIVEIRA, I. D. S. D. S. MORAGAS, C. J. T. CHAGAS, M. D. S. D. S. BEHRENSM. D. CALABRESE, K. D. S. ABREU-SILVA, A.L. ALMEIDA-SOUZA, F. *Carapa guianensis* Aublet (Andiroba) seed oil: chemical composition and antileishmanial activity of limonoid-rich fractions. *BioMed Research International*, p. 1 – 10, 2018.

OSÓRIO-DE-CASTRO, C.G.S. MIRANDA, E.S. ESHER, A. CAMPOS, M.R. BRASIL. J.C. FERREIRA, A.C.S. EMMERICK. I.C.M. Conhecimentos, práticas e percepções de profissionais de saúde sobre o tratamento de malária não complicada em municípios de alto risco da Amazônia Legal. *Ciência e Saúde Coletiva*, v. 16, Supl. 1, p. 1445-1456, 2011.

ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DE SAÚDE. Casos de malária aumentam na região das Américas. Brasil. Disponível: https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5591:casos-de-malaria-aumentam-na-regiao-das-americas&Itemid=812 . Acesso em: 10 dez, 2020.

OTTO, T.D. BÖHME, U. JACKSON, A.P. HUNT, M. FRANKE-FAYARD, B. HOEIJMAKERS, W.A. RELIGA, A.A. ROBERTSON, L. SANDERS, M. OGUN, S.A. CUNNINGHAM, D. ERHART, A. BILLKER, O. KHAN, S.M. STUNNENBERG, H.G. LANGHORNE, J. HOLDER, A.A. WATERS, A.P. NEWBOLD, C.I. PAIN, A. BERRIMAN, M. JANSE, C.J. A comprehensive evaluation of rodent malaria parasite genomes and gene expression. *BMC Biology*, London, Oct 30;12:86, 2014.

PAULA, C. S. CANTELI, V. C. D. VERDAM, M. C. S. KALEGARI, M. CAMPOS, R. HIROTA, B. C. K. MIGUEL, O. G. M. MIGUEL, M. D. Atividade antioxidante e toxicidade preliminar do extrato e frações obtidas das folhas e cascas do caule de *Dasyphyllum tomentosum* (Spreng.). *Cabrera. Rev. Bras. Plan. Med.*, Campinas, v.16, n.2, p.189-195, 2014.

PERANDIN, F. MANCA, N. CALDERARO, A. PICCOLO, G. GALATI, L. RICCI, L. MEDICI, M.C. ARCANGELETTI, M.C. SNOUNOU, G. DETTORI, G. CHEZZI, C. Development of a real-time PCR assay for detection of *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, and *Plasmodium ovale* for routine clinical diagnosis. *Journal of Clinical Microbiology*. Mar;42(3):1214-9, 2004.

PEREIRA, T. B. ROCHA, E. SILVA, L.F. AMORIM, R.C.N. MELO, M.R.S, SOUZA, R.C.Z. EBERLIN, M.N. LIMA, E.S. VASCONCELOS, M.C. POHLIT, A.M. Atividade antimalárica in vitro e in vivo de limonóides isolados da biomassa residual de sementes da produção de óleo de *Carapa guianensis* (andiroba). *Malaria Journal*, 13, 317, 2014.

PERON, L. M. Avaliação dos limonóides presentes no resíduo industrial de andiroba (*Carapa guianensis*) usando cromatografia líquida de ultra eficiência acoplado à espectrometria de massas (CLUE-EM). / Leticia Marques Peron. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.

PESSOA, S.B.; MARTINS, A.V. Gênero *Plasmodium* - Parasitas da malária. In: *Parasitologia Médica*. 11ª.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; p.280-291, 1982.

PENIDO, C. COSTA, K.A. PENNAFORTE, R.J. COSTA, M.F.S. PEREIRA, J.F.G. SIANI, A.C. HENRIQUES, M.G.M.O. Anti-allergic effects of natural tetranortriterpenoids isolated from *Carapa guianensis* Aublet on allergen-induced vascular permeability and hyperalgesia. *Inflamm. Res.*, v.54, p.295-303, 2005.

PIRES, A. BORGES, A. ADRAGÃO, T. SILVA, M. BORGES, F. Malária e Rim. *Medicina Interna* ;8:2, 2001.

PROPHIRO, J. S. SILVA, M. A. N. KANIS, L. A. SILVA, B. M. LUNA, J. E. D. Evaluation of time toxicity, residual effect, and growth-inhibiting property of *Carapa guianensis* and *Copaifera* sp. in *Aedes aegypti*. *Parasitology Research*, v. 110, n. 2, p. 713–719, 2012.

REY, L. Malária: Os Plasmódios Humanos. In: *Bases da Parasitologia Médica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; p. 106-114, 1992.

REY, L. *Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África*. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, pp. 335–399, 2001.

RÍOS VELÁSQUEZ, C.M. Suscetibilidade e resposta imune de mosquitos *Anopheles* (Diptera: Culicidae) da Região Amazônica Brasileira quando infectados experimentalmente por *Plasmodium vivax* /. Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Biologia Celular e Molécula – Belo Horizonte, 2014.

ROBERT, A. BENOIT-VICAL, F. DECHY-CABARET, O. MEUNIER, B. From classical antimalarial drugs to new compounds based on the mechanism of action of artemisinin. *Pure Appl. Chem*, 73, 1173, 2001.

ROSA, C. CÂMARA, S. G. BÉRIA, J. U. Representações e intenção de uso da fitoterapia na atenção básica à saúde. *Ciência e Saúde Coletiva*, v. 16, n. 1, p. 311318, 2011.

ROUCHER, C. ROGIER, C. SOKHNA, C. ALTO, A. TRAPE, J.F. Um estudo longitudinal de 20 anos da prevalência e morbidade de *Plasmodium ovale* e *Plasmodium malariae* em uma população da África Ocidental. *PLoS One*; 9: e87169. 10.1371 / journal.pone.0087169, 2014.

SAAD, G. A. LÉDA, G.A. OLIVEIRA, P. H. SÁ, I. M. SEIXLACK, A. C. C. Fitoterapia popular contemporânea: tradição e ciência na prática clínica. 1º ed. Elsevier. p. 402, 2009.

SAHU, N. K. SAHU, S. KOHLI, D. V. Novel Molecular Targets for Antimalarial Drug Development. *Chemical Biology & Drug Design*, v. 71, n. 4, p. 287-297, 2008.

SANTOS, A.C. FERNANDES, C.C. LOPES, L.M. SOUSA, A.H. INSETICIDAL OILS FROM AMAZON PLANTS IN CONTROL OF FALL ARMYWORM. *Revista Caatinga*, Mossoró, v. 29, n. 3, p. 642 – 647, jul. – set., 2016.

SCHUCK, D.C. Novos compostos sintéticos com ação no ciclo de vida de parasitas de malária humana, *Plasmodium falciparum*. Tese (Doutorado em Parasitologia) Sao Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de Sao Paulo, 2013.

SILVA, D.M.H. BASTOS, C.N. Atividade antifúngica de óleos essenciais de espécies de Piper sobre *Crinipellis pernicioso*, *Phytophthora palmivora* e *Phytophthora capsici*. *Fitopatologia Brasileira* v. 32, p. 143-145, 2007.

SILVA, L.F.R. Identificação de potenciais novos antimaláricos a partir de produtos naturais de plantas amazônicas, e seus derivados: estudos in vitro, in vivo e de mecanismo de ação. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas, 2014.

SILVA, M.F.S. Avaliação da ação antimalárica de compostos sintéticos derivados de quinolina em cultura de *Plasmodium falciparum*. 2013 Tese (Mestrado em Imunologia e DIP) Juiz de Fora: Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Juiz de Fora, 2013.

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

SILVA, V. P. OLIVEIRA, R. R. FIGUEIREDO, M. R. Isolation of Limonoids from seeds of *Carapa guianensis* Aublet (Meliaceae) by high-speed countercurrent chromatography. *Phytochemical Analysis*, v. 20, n. 1, p. 77-81, 2009.

SILVA, O. S. PROPHIRO, J. S. NOGARED, J. C. KANIS, L. EMERICK, S. BLAZIUS, R.D. ROMÃO, P.R. Larvicidal effect of andiroba oil, *Carapa guianensis* (meliaceae), against *Aedes aegypti*. *Journal of the American Mosquito Control Association*, v. 22, n. 4, p. 699–701, 2006.

SILVA, F. R. P. ALMEIDA, S. S. M. S. Análise fitoquímica e microbiológica da atividade do extrato bruto etanólico da Andiroba, *Carapa guianensis* Aubl. *Biota Amazônia*, Macapá, v. 4, n. 4, p. 10-14, 2014.

SIMÃO, C. STONE, R. ALMEIDA, M. Insuficiência renal associada a infecção por *Plasmodium falciparum*. *Acta Médica Portuguesa* ;16: 93-95, 2003.

SIQUEIRA, A.M. CAVALCANTE, J.A. SILVA, S.V. LECCA, R.C.R. ALENCAR, A.C. MONTEIRO, M.W. ALEXANDRE, M.A.A. MOURAO, M.P.G. GUINOVART, C. BASSAT, Q. ALECRIM, M.G. LACERDA, M.V.G. Influence of age on the haemoglobin concentration of malaria-infected patients in a reference centre in the Brazilian Amazon. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, V. 108, n. 5, 569-576, 2014.

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

SOMSAK, V. KITTITORN, J. CHACHIYO, S. SRICHAIRATANAKOOL, S. UTHAIPIBULL, C. 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. SIMÕES, C.M.O. SCHENKEL, E.P. GOSMANN, G. MELLO, J.C.P. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. p. 289-326, 2003.

SOULARD, V. BOSSON-VANGA, H. LORTHIOIS, A. ROUCHER, C. FRANETICH, J.F. ZANGHI, G. BORDESSOULLES, M. TEFIT, M. THELLIER, M. MOROSAN, S. NAOUR, G.L. CAPRON, F. SUEMIZU, H. SNOUNOU, G. MORENO-SABATER, A. MAZIER, D. *Plasmodium falciparum* full life cycle and *Plasmodium ovale* liver stages in humanized mice. *Nature Communications*, v. 6. n. 7690, 2015.

SOUSA, R. L. ALMEIDA, B. B. SILVA, R. P. ALBUQUERQUE, L. C. S. CORDEIRO, Y. E. M. Óleo de andiroba: extração, comercialização e usos tradicionais na comunidade Mamangal, Igarapé-Miri, Pará. *Biodiversidade*, 18(1). <https://periodicoscientificos.ufmt.br/ojs/index.php/biodiversidade/article/view/8236>, 2019.

SOUSA, S. F. PAES, J. B. ARANTES, M. D. C. LOPEZ, Y. M. BROCCO, V. F. Análise física e avaliação do efeito antifúngico dos óleos de andiroba, copaíba e pinhão-mansão. *Floresta*, 48(2), 153-162. <https://revistas.ufpr.br/floresta/article/view/52280>, 2018.

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

SOUZA, B. A. A. BRAGA, L. A. LOPES, L. R. O. JUNIOR, R. F. G. R. NASCIMENTO, L. N. S. CAVALCANTE, L.C.C. MONTEIRO, A.M. COUTEIRO, R.P. YASOJIMA, E.Y. HAMOY, M. Effects of andiroba oil (*Carapa Guianensis*) on wound healing in alloxan-diabetic rats. *International Archives of Medicine*, v. 10, n. 263, p. 1-6, 2017.

STROBEL, G. DAISY, B. Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. *Microbiol Mol Biol Rev. Dec*; 67(4): 491–502, 2003.

TANGPUKDEE, N. DUANGDEE, C. WILAIRATANA, P. KRUDSOOD, S. Malaria Diagnosis: A Brief Review. *The Korean Journal Parasitology*. Jun; 47(2): 93–102, 2009.

TAPPIN, M.R. NAKAMURA, M.J. SIANI, A.C. LUCCHETTI, L. Development of an HPLC method for the determination of tetranortriterpenoids in *Carapa guianensis* seed oil by experimental design. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, Dec 1;48(4):1090-5, 2008.

TARANTO, A, G.; CARNEIRO, J. W. M.; ARAUJO, M. T.; SILVA, B. M. S. Estudos sobre o mecanismo de ação da artemisinina e dos endoperóxidos, a mais nova classe de agentes antimaláricos - PARTE I. Universidade Estadual de Feira de Santana – Dep. de Saúde. Feira de Santana, n.34, p.47-58, jan./jun, 2006.

VAN DER HEYDE, H.C. NOLAN, J. COMBES, V. GRAMAGLIA, I. GRAU, G.E. A unified hypothesis for the genesis of cerebral malaria: sequestration, inflammation and hemostasis leading to microcirculatory dysfunction. *Trends Parasitol.* 22(11): 503-508, 2006.

VALADARES, M. C. Avaliação de toxicidade aguda: estratégias após a “era do teste DL50”. *Revista Eletrônica de Farmácia* Vol 3(2), 93-98, 2006.

VEIGA, V.F.J.; PINTO, A.C.; MACIEL, M.A.M. Plantas medicinais: cura segura? *Quim Nova*. mai-jun;28(3):519-28, 2005.

VENTURA, A.M.R.S. Anemia da Malária por *Plasmodium vivax*: Estudo Clínico e Laboratorial em Crianças e Adolescentes. Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Medicina, área de concentração: Medicina Tropical. Rio de Janeiro, 2010.

VERONESI, R. FOCACCIA, R. Imunologia e imunopatologia da malária. *Tratado de Infectologia*. São Paulo: Atheneu, p.1268-1272, 1999.

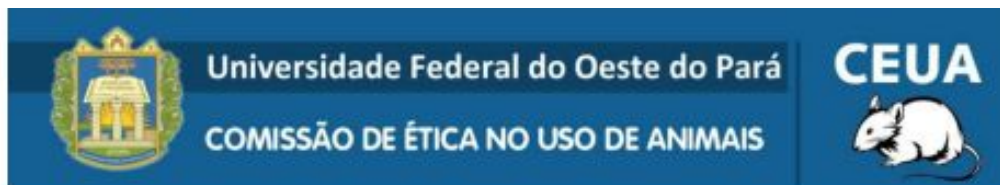
WEISS, G. E. TRAORE, B. KAYENTAO, K. ONGOIBA, A. DOUMBO, S. DOUMTABE, D. KONE, KONE, Y. DIA, S. GUINDO, A. TRAORE, A. HUANG, C.Y. MIURA, K. MIRCETIC, M. LI, S. BAUGHMAN, A. NARUM, D.L. MILLER, L.H. DOUMBO, O.K. PIERCE, S.K. The plasmodium falciparum-specific human memory b cell compartment expands gradually with repeated malaria infections. *PLoS Pathogens*, v. 6, n. 5, p. 1–13, 2010.

WHITE, N.J. *Plasmodium knowlesi*: the fifth human malaria parasite. *Clin. Infect. Dis.* 46:172–173, 2008.

World Health Organization. Information on malaria, 2004 [monography on the Internet]. Geneva: WHO; [cited 2019 dez. 22]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en> : Acesso em Dezembro de 2019.

WU, Y. How might qinghaosu (artemisinin) and related compounds kill the intraerythrocytic malaria parasite? A chemist’s view. *Accounts of Chemistry Research*. May;35(5):255-9, 2022.

ANEXO A – CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo N° 0520220199, intitulado **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMALÁRICA IN VIVO DO EXTRATO ACETÔNICO DO RESÍDUO INDUSTRIAL DE ANDIROBA** (*Carapa guianensis* aubl., **Meliaceae**), sob a responsabilidade de **Waldiney Pires Moraes**, está de acordo com os Princípios éticos na Experimentação Animal adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Oeste do Pará - UFOPA.

CERTIFICATE

We certify that the protocol N° 0520220199, entitled "**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMALÁRICA IN VIVO DO EXTRATO ACETÔNICO DO RESÍDUO INDUSTRIAL DE ANDIROBA** (*Carapa guianensis* aubl., **Meliaceae**)", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA). This project was approved by the institutional Commission for Ethics in the Use of Animals of Universidade Federal do Oeste do Pará.

Santarém-PA, 22/08/2022

Profª. Dra. Adriana Caroprezo Morini
Presidente

Verificar a autenticidade do certificado em <http://ufopa.edu.br/ceua/validar-certificado>