



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

FRANCISCO FLÁVIO VIEIRA DE ASSIS

ATIVIDADE ANTI-PLASMODIAL DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE
Libidibia ferrea Mart. ex Tul. var. ferrea

SANTARÉM- PA
2022

FRANCISCO FLÁVIO VIEIRA DE ASSIS

ATIVIDADE ANTI-PLASMODIAL DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE
Libidibia ferrea Mart. ex Tul. var. ferrea

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

Orientador: Prof. Dr. Antonio Humberto Hamad Minervino

SANTARÉM- PA
2022

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

- A848a Assis, Francisco Flávio Vieira de
Atividade anti-plasmodial do extrato hidroalcolico de *Libidibia ferrea* Mart. ex
Tul. var. *ferrea* ./ Francisco Flávio Vieira de Assis. – Santarém, 2022.
50 fls. : il.
Inclui bibliografias.
- Orientador: Antônio Humberto Hamad Minervino.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Oeste do Pará, Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação Tecnológica, Instituto de Biodiversidade e Florestas, Programa de Pós-Graduação em Biociências.
1. Malária. 2. jucá. 3. Fitoterápicos. 4. Amazônia. 5. Saúde. I. Minervino, Antônio Humberto Hamad, *orient.* II. Título.

CDD: 23 ed. 614.4323



MINISTÉRIO DA
EDUCAÇÃO UNIVERSIDADE
FEDERAL DO OESTE DO PARÁ
COORDENAÇÃO DO INSTITUTO DE BIODIVERSIDADE E FLORESTAS



ATA CIBEF/IBEF/REITORIA/UFOPA Nº 6, DE 08
DE AGOSTO DE 2022

Ao oitavo dia do mês de agosto, do ano de dois mil e vinte e dois, às 8H, por videochamada <https://meet.google.com/vmr-ngss-hpa>, instalou-se a banca Examinadora e Julgadora da Dissertação do Mestrando FRANCISCO FLÁVIO VIEIRA DE ASSIS. A banca examinadora foi composta pelos professores Dr. Antonio Humberto Hamad Minervino, PRESIDENTE; examinador externo, Dr. Fábio Edir Amaral Albuquerque, PPGSND – UFOPA; examinador interno, prof. Dr. Waldiney Pires Moraes, UFOPA. Deu-se a abertura dos trabalhos, por parte do professor Antonio Humberto Hamad Minervino, Orientador da Pesquisa, que, após apresentar os membros da banca Examinadora e Julgadora e esclarecer a tramitação do procedimento para a defesa, de imediato, solicitou a(o) Mestrando (a) que iniciasse a apresentação da dissertação, intitulada ATIVIDADE ANTI-PLASMODIAL DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE

Libidibia ferrea Mart. ex Tul. var. ferrea, marcando um tempo de 28 minutos de apresentação. Concluída a exposição, o Prof. Antonio Humberto Hamad Minervino, Presidente, passou a palavra ao examinador externo, Dr. Fábio Edir Amaral Albuquerque, para arguir o candidato ao título de Mestre em Biociências, e, em seguida, ao examinador interno, Prof. Dr. Waldiney Pires Moraes, na mesma condição, para que fizesse o mesmo. Após, exibiu suas considerações sobre o trabalho em julgamento; tendo sido considerado **aprovado** o Mestrando, conforme as normas vigentes na Universidade Federal do Oeste do Pará. A versão final da dissertação deverá ser entregue ao programa, em até 30 (trinta) dias, via procedimentos para a conclusão, no SIGAA, contendo as modificações sugeridas pela banca Examinadora e Julgadora constante na folha de correção anexa. Conforme exigência deste Programa, o orientando não obterá o título se não comprovar a submissão de artigo científico para publicação.

(Assinado digitalmente em 08/08/2022 16:51)
ANTONIO HUMBERTO HAMAD MINERVINO
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
CPPGSND (11.01.02.06.01)
Matrícula: ###439#3

(Assinado digitalmente em 08/08/2022 18:52)
WALDINEY PIRES MORAES
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
ISCO (11.01.45)
Matrícula: ###343#5

(Assinado digitalmente em 08/08/2022 13:56)
FÁBIO EDIR AMARAL ALBUQUERQUE
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ###.###.112-##

(Assinado digitalmente em 08/08/2022 13:58)
FRANCISCO FLÁVIO VIEIRA DE ASSIS
DISCENTE
Matrícula: 2020#####5

AGRADECIMENTOS

A minha noiva e minha filha pela dedicação, companheirismo, generosidade, humildade e pelo apoio. As pessoas que me fazem feliz todos os dias.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Antonio Humberto Hamad Minervino, que me acolheu e foi referência de pesquisador e toda a equipe no laboratório de Sanidade Animal da Universidade Federal do Oeste do Pará.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para construção desta pesquisa.

Muito obrigado!

RESUMO

A malária é uma doença infecciosa e parasitária, que afeta milhões de pessoas nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. No Brasil, a maioria dos casos estão na Amazônia Legal devido especialmente às condições favoráveis para a existência do vetor. A malária, doença causada por protozoários do gênero *Plasmodium*, é a protozoose que mais mata seres humanos no mundo. A resistência descrita no sudeste da Ásia do *Plasmodium falciparum*, à derivados de artemisina, droga classicamente utilizada no tratamento da doença, ameaça o controle da malária, ressaltando a necessidade do desenvolvimento de novos medicamentos, em especial os produtos naturais. Os medicamentos oriundos de substâncias naturais são capazes de tratar cerca de 80% das enfermidades que acometem a humanidade. *Libidibia ferrea* Mart. ex Tul. var. *ferrea*, é uma árvore que cresce em todo o Brasil, sendo encontrada, principalmente, na região Norte e Nordeste, sendo conhecida vulgarmente como jucá. O jucá, tem sido muito investigado por suas diversas propriedades biológicas (anti-inflamatória, analgésica, anticancerígena, antioxidante, antimicrobiana e cicatrizante) mas não existem estudos sobre sua ação contra parasitas do gênero *Plasmodium*. Neste contexto, objetivou-se avaliar a atividade anti-plasmodial *in vitro* do extrato hidroalcoólico de Jucá (*L. ferrea*) (EHJ). A preparação do extrato hidroalcoólico de Jucá foi realizada utilizando frutos, os frutos (1,5 kg) foram higienizados com álcool 70° Gl e secos em temperatura ambiente. Após 48 horas os frutos foram colocados em estufa de circulação de ar forçado microprocessada a 40°C por 72h. Posteriormente, os frutos foram triturados e colocados para maceração em álcool 96° Gl, na proporção de 5 litros para 1 kg de fruto, durante 7 dias. Em seguida, o macerado foi filtrado e a tintura extraída por meio de rotaevaporador. Para o ensaio de citotoxicidade foi utilizado o método de MTT com células WI-26VA4 (fibroblasto pulmonar ATCC CCL-75). Este teste consiste na avaliação colorimétrica rápida do crescimento de linhagens celulares *in vitro*. Para obtenção das fases intraeritrocitárias de *Plasmodium falciparum*, os parasitos da cepa W2 (cloroquina-resistente) foram cultivados em hemácias humanas *in vitro* sob condições ideais para o crescimento. Para o teste anti-plasmodial as culturas sincronizadas do *P. falciparum* com 0,5% de parasitemia em estágio de anel e 2% de hematócrito foram distribuídas em placa de 96 poços (180µL por poço). O composto testado foi adicionado (20µL) à placa-teste, em triplicata, e em diferentes concentrações seriadas de 50 a 0,20µg/mL. Nos testes realizados, a citotoxicidade foi registrada como a porcentagem de redução na absorbância. O extrato hidroalcoólico de Jucá não apresentou atividade citotóxica por MTT, com valor de IC50 superior a 100 µg/ml. Na determinação do IC50 por teste anti-plasmodial o valor foi de 11,10

$\mu\text{g/ml}$. Além disso, obteve-se o índice de seletividade (IS) 9, que corresponde à relação entre as atividades citotóxicas e anti-plasmodial do extrato hidroalcoólico de Jucá. O extrato apresentou baixa atividade hemolítica nas maiores concentrações e não apresentou atividade hemolítica nas menores concentrações testadas. Devido a sua atividade anti-plasmodial nas concentrações testadas e baixa toxicidade, o extrato de Jucá apresenta-se como candidato a fitoterápico no tratamento de malária, podendo ainda potencializar seu efeito se associado com outros fitoterápicos.

PALAVRAS-CHAVE: Malária. Jucá. Fitoterápicos. Amazônia. Saúde.

ABSTRACT

Malaria is an infectious and parasitic disease that affects millions of people in the tropical and subtropical regions of the world. In Brazil, most cases are in the Legal Amazon, especially due to the favorable conditions for the existence of the vector. Malaria, a disease caused by protozoa of the genus *Plasmodium*, is the protozoan that kills most human beings in the world. The resistance described in Southeast Asia by *Plasmodium falciparum*, to artemisinin derivatives, a drug classically used to treat the disease, threatens malaria control, highlighting the need for the development of new drugs, especially natural products. Medicines from natural substances are able to treat about 80% of the diseases that affect humanity. *Libidibia ferrea* Mart. ex Tul. var. *ferrea*, is a tree that grows throughout Brazil, being found mainly in the North and Northeast regions, being commonly known as jucá. Jucá has been extensively investigated for its various biological properties (anti-inflammatory, analgesic, anticancer, antioxidant, antimicrobial and healing) but there are no studies on its action against *Plasmodium* parasites. In this context, the objective was to evaluate the in vitro anti-plasmodial activity of the hydroalcoholic extract of Jucá (*L. ferrea*) (EHJ). The preparation of the hydroalcoholic extract of Jucá was carried out using fruits, the fruits (1.5 kg) were sanitized with 70° Gl alcohol and dried at room temperature. After 48 hours, the fruits were placed in a forced air circulation oven at 40°C for 72 hours. Subsequently, the fruits were crushed and placed for maceration in 96° Gl alcohol, in the proportion of 5 liters to 1 kg of fruit, for 7 days. Then, the macerate was filtered and the tincture was extracted using a rotary evaporator. For the cytotoxicity assay, the MTT method with WI-26VA4 cells (ATCC CCL-75 lung fibroblast) was used. This test consists of the rapid colorimetric evaluation of the growth of cell lines in vitro. To obtain the intraerythrocyte phases of *Plasmodium falciparum*, parasites of the W2 strain (chloroquine-resistant) were cultured in human red blood cells in vitro under ideal conditions for growth. For the anti-plasmodial test, synchronized cultures of *P. falciparum* with 0.5% ring-stage parasitemia and 2% hematocrit were distributed in a 96-well plate (180µL per well). The tested compound was added (20µL) to the test plate, in triplicate, and in different serial concentrations from 50 to 0.20µg/mL. In the tests performed, cytotoxicity was recorded as the percentage of reduction in absorbance. The hydroalcoholic extract of Jucá did not show cytotoxic activity by MTT, with an IC₅₀ value greater than 100 µg/ml. In the determination of IC₅₀ by anti-plasmodial test, the value was 11.10 µg/ml. In addition, the selectivity index (SI) 9 was obtained, which corresponds to the relationship between the cytotoxic and anti-plasmodial activities of the hydroalcoholic extract of Jucá. The extract showed low hemolytic activity at the highest concentrations and did not

show hemolytic activity at the lowest concentrations tested. Due to its anti-plasmodial activity at the concentrations tested and low toxicity, the Jucá extract is presented as a candidate for herbal medicine in the treatment of malaria, and may also potentiate its effect if associated with other herbal medicines.

KEYWORDS: Malaria. Jucá. Herbal medicines. Amazon. Health.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição química do extrato hidroalcoólico de *Libidibia ferrea*. Tr: tempo de retenção. Rel.: fração em porcentagem da área total integrada para o cromatograma..... 40

Tabela 2: Resultados in vitro para a atividade anti-plasmodial (IC50) do extrato hidroalcoólico de Jucá contra a cepa W2 de *P. falciparum*, IC50 na linhagem celular humana WI-26-VA-4 e índice de seletividade do extrato. 41

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo de Vida do <i>Plasmodium</i>	18
Figura 2: Cromatograma HPLC-DAD do extrato hidroalcoólico de <i>Libidibia ferrea</i> . AU: Absorbância.	39

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Capacidade hemolítica do EHJ em diferentes concentrações. *Diferenças estatisticamente significativa ($p < 0,05$).	41
---	----

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

Abs	Absorbância
cm ²	Centímetro quadrado
CO ₂	Dióxido de carbono
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EHJ	Extrato hidroalcoólico
HPLC-DAD	Cromatógrafo líquido de alta eficiência com Detector DAD
IC ₅₀	Metade da concentração máxima inibitória
iRBC	Red blood cells infected
IS	Índice de seletividade
µg	Micrograma
µM	Micromol
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimol
Nm	Nanômetro
PBS	Phosphate buffered saline
pH	Potencial hidrogeniônico
RBC	Red blood cells
Rpm	Rotação por minuto
RPMI	Roswell park memorial institute
SBF	Soro fetal bovino
Tr	Tempo de retenção
v/v	Volume-volume
MTT	Brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazol

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	Malária	15
1.2	<i>Libidibia ferrea</i>	16
2	REFERÊNCIAL TEÓRICO	16
2.1	Características da Malária	16
2.2	Vacina	17
2.3	Ciclo Biológico do <i>Plasmodium</i>	17
2.4	Patogenia da Malária	19
2.5	Diagnóstico	21
2.6	Diagnóstico Clínico da Malária	22
2.7	Diagnóstico Laboratorial da Malária	22
2.8	Drogas Antimaláricas	24
2.9	Derivados da Artemisinina	26
2.10	Plantas Medicinais	27
2.11	<i>Libidibia ferrea</i>	28
2.12	Atividades Biológicas e Uso Do Jucá	29
3	OBJETIVOS	32
3.1	Geral	32
3.2	Específicos	32
4	MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1	Material Botânico	33
4.2	Análise Cromatográfica	33
4.3	Solubilização do Composto Para Testes Com Atividade Biológica	33
4.4	Ensaio Biológicos	34
4.4.1	Cultivo das linhagens celulares humana	34
4.4.2	Ensaio de Citotoxicidade	35
4.4.3	Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Plasmodium spp.</i>	36
4.4.4	Cultivo <i>in vitro</i> das fases intraeritrocitárias de <i>Plasmodium falciparum</i>	36
4.4.5	Determinação da parasitemia	36
4.4.6	Sincronização do cultivo de <i>Plasmodium falciparum</i>	37
4.4.7	Testes esquizonticidas <i>in vitro</i> com <i>Plasmodium falciparum</i> utilizando o ensaio antimalárico com SybrGreen I (SMILKSTEIN et al., 2004)	37
4.4.8	Índice de Seletividade	38

4.4.9	Avaliação da atividade Hemolítica	38
4.5	Análise Estatística.....	39
5	RESULTADOS	39
5.1	Análise Cromatográfica do EHJ	39
5.2	Atividade Anti-plasmodial e Citotoxicidade.....	40
5.3	Atividade Hemolítica	41
6	DISCUSSÃO	43
7	CONCLUSÃO	45
8	REFERÊNCIAS	46

1 INTRODUÇÃO

1.1 Malária

A malária é uma doença infecciosa e parasitária, que afeta milhões de pessoas nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. Principalmente na África, no Sudeste Asiático e na Região Amazônica da América do Sul (REINERS et al., 2010). Segundo a World malaria report (2018) ocorreram 219 milhões de casos de malária em todo o mundo em 2017 com 435.000 mortes.

No Brasil, a maioria dos casos estão na Amazônia Legal, que compreende os Estados do Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins, devido entre outros fatores, às condições favoráveis para a existência do vetor, a falta de saneamento adequado e assentamentos desordenados acarretando sérios problemas na saúde pública e grande impacto econômico acometendo milhões de pessoas (MENEGUETTI et al., 2014; REINERS et al., 2010).

A malária, doença causada por protozoários do gênero *Plasmodium*, é a protozoose de maior impacto no mundo, colocando sob risco aproximadamente 40% da população mundial (cerca de 2,4 bilhões de pessoas), em mais de 100 países (GOMES et al., 2011). Esta doença é transmitida ao homem por fêmeas de mosquitos do gênero *Anopheles* infectadas. O *P. falciparum* é a espécie mais perigosa do gênero pois pode levar a forma mais grave de malária, a cerebral, que na maioria dos casos leva à morte (FRANÇA; DOS SANTOS; FIGUEROA-VILLAR, 2008).

A resistência do *Plasmodium falciparum* a derivados de artemisina no sudeste da Ásia ameaça o controle da malária (ARIEY et al., 2014). A busca por novas drogas para o tratamento está aumentando de forma constante devido à resistência do parasita a terapia tradicional (MENEGUETTI et al., 2014).

É reconhecida a importância dos produtos naturais, incluindo aqueles derivados de plantas, no desenvolvimento de modernas drogas terapêuticas, estima-se que, aproximadamente 40% dos medicamentos atualmente disponíveis foram desenvolvidos direta ou indiretamente a partir de fontes naturais, destes, 25% são provenientes de plantas medicinais (CALIXTO et al., 2001; DELMACIA et al., 2015). Há grande diversidade de espécies de plantas na Amazônia brasileira com potencial para a investigação de novos metabólitos secundários com ação antiplasmódica (MENEGUETTI et al., 2014).

1.2 *Libidibia ferrea*

As plantas podem ser encontradas em todos os habitats do nosso planeta, no entanto, é nos países com clima tropical que existe maior variedade delas. As preparações a base destes produtos são bastante conhecidas popularmente em países em desenvolvimento, principalmente pelo aspecto cultural do uso e pela crença no poder medicinal (SCHULZ et al., 2013). Os medicamentos oriundos de substâncias naturais são capazes de tratar cerca de 80% das enfermidades que acometem a humanidade. Apresentando várias atividades farmacológicas como antimicrobianos, anticoagulantes, antiparasitárias, imunossupressores dentre outros (NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2003).

Libidibia ferrea Mart. ex Tul. var. *ferrea*, é uma árvore que cresce em todo o Brasil, sendo encontrada, principalmente, na região Norte e Nordeste, sendo conhecida vulgarmente como jucá ou pau-ferro, este último devido à rigidez do seu lenho (FREITAS, 2012; LORENZI, 2002). Espécie economicamente importante, é utilizada como planta ornamental e na construção civil, além de forrageira (FREITAS, 2012).

Na região amazônica a *Libidibia ferrea* tem extenso uso na medicina popular, conhecida principalmente como “jucá”, sendo indicada para tratar diversas afecções de saúde, na forma de chás e infusões para tratamento de afecções bronco-pulmonares, diabetes, reumatismo, câncer, distúrbios gastrintestinais, diarreia; além do tratamento tópico de feridas e contusões (OLIVEIRA et al., 2010; PAIVA et al., 2015; SOUSA, 2017).

O jucá (*Libidibia ferrea*), tem sido muito investigado do ponto de vista de suas diversas propriedades biológicas tais quais: anti-inflamatória, analgésica, anticancerígena, anti-úlceras, antioxidante e antimicrobiana (BORGES et al., 2008; FERREIRA, 2012; GONZALEZ, 2005; HENRIQUE, 2016; MAGALHÃES et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2014; PAIVA et al., 2015). Existem ainda estudos sobre a composição fitoquímica da planta, destacando-se entre os componentes já isolados os compostos fenólicos, flavonoides e taninos (KOBAYASHI et al., 2015; MAGALHÃES et al., 2015).

2 REFERÊNCIAL TEÓRICO

2.1 Características da Malária

A malária é uma doença infecciosa e parasitária, provocada por protozoários intracelulares do subfilo Apicomplexa do gênero *Plasmodium*, que possui aproximadamente

150 espécies, em que somente cinco são descritas como responsáveis por infectar seres humanos: *P. falciparum*; *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* e *P. knowlesi*. A transmissão ao homem ocorre através da picada da fêmeas da mosquitos do gênero *Anopheles* infectadas (NEVES *et al.*, 2011; SINGH; DANESHVAR, 2013).

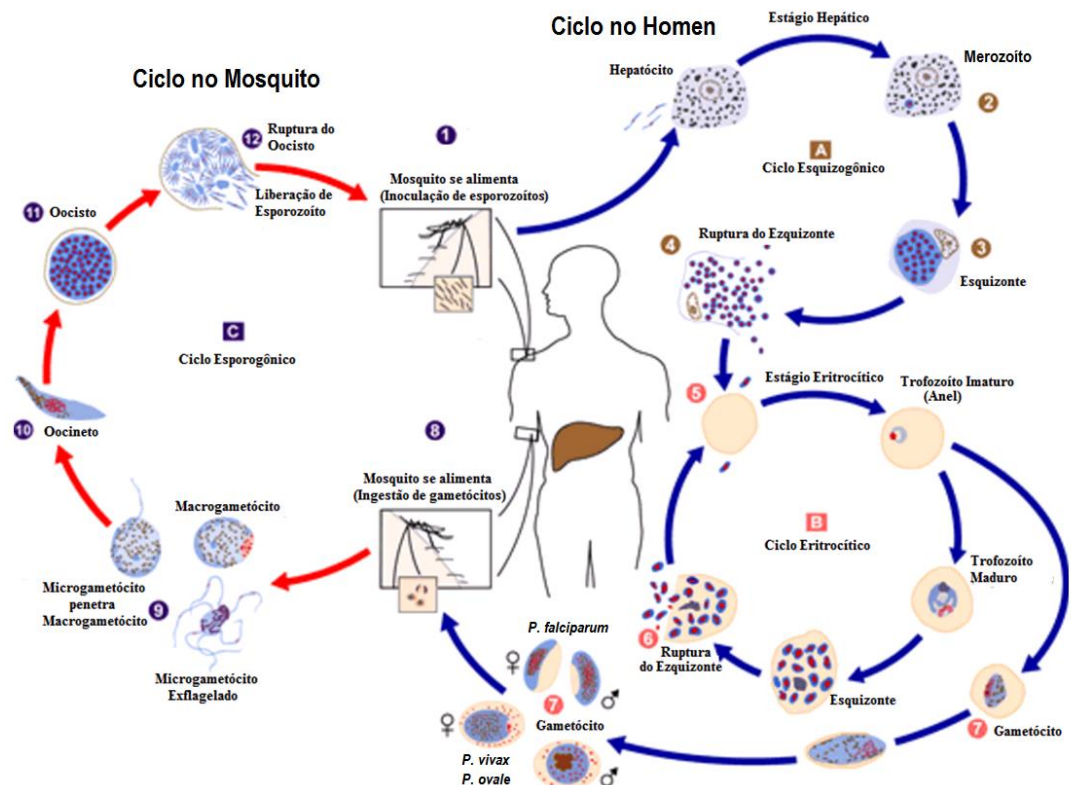
A infecção ocasionada pelo *P. falciparum* é considerada a mais letal; A espécie *P. vivax* é amplamente distribuída pelos trópicos; A espécie *P. malariae* possui distribuição esporádica; O *P. ovale* encontra-se restrito na região Centro-Oeste da África em algumas ilhas do Pacífico Sul; A espécie *P.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

2.2 Vacina

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

2.3 Ciclo Biológico do *Plasmodium*

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

Figura 1: Ciclo de Vida do *Plasmodium*

Fonte: Adaptado de CDC, (2016).

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

Ao maturar-se, o esquizonte hepático se rompe, liberando milhares de merozoítos na corrente sanguínea, onde invadem os eritrócitos a fim de continuar seu desenvolvimento, dando início ao ciclo eritrocítico. No interior dos eritrócitos, os merozoítos diferenciam-se em trofozoítos, formando um anel que, posteriormente, desenvolve-se em esquizonte. A segmentação do esquizonte contém inúmeros novos merozoítos que, ao romperem a membrana celular, caem na circulação infectando novos glóbulos vermelhos, reiniciando dessa forma, o ciclo (SINGH; DANESHVAR, 2013).

Após algumas gerações, aproximadamente de 10-12 dias, os merozoítos se diferenciam em gametócitos haploides masculinos e femininos, sendo essenciais para a reprodução sexual. Estes, após serem ingeridos pelo mosquito, passam pelo processo de

fertilização, dando origem a uma célula diploide (2n) chamada zigoto. Posteriormente o zigoto diferencia-se em uma forma móvel tetraploide (4n), denominada oocineto, que migra para o intestino do mosquito e ao se fixar no epitélio intestinal, desenvolve-se em oocisto. A ruptura do oocisto libera esporozoítos maduros que migram para a glândula salivar do mosquito, facilitando dessa maneira, a transmissão do parasito para o hospedeiro humano ao alimentar-se (GERALD *et al.*, 2011; JOSLING; LLINÁS, 2015).

2.4 Patogenia da Malária

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

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

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

Durante a fase intraeritrocitária, o desenvolvimento do parasito causa alterações moleculares levando a remodelação do eritrócito infectado e não infectado, modificando as propriedades de aderência e deformidade e, conseqüentemente, o sequestro das células pelo baço, contribuindo para o desenvolvimento da anemia e manifestações clínicas. As principais alterações hematológicas associadas à malária são: Eosinopenia; Linfopenia provocada pela

redistribuição dos linfócitos; Trombocitopenia leve ou moderada relacionada à coagulação intravascular, durante os primeiros dois dias há uma neutrofilia seguido de neutropenia com desvio a esquerda; Plaquetopenia leve ou moderada sem manifestação hemorrágica; e monocitose. Nota-se a formação de rouleaux provocado pela hipergamaglobulinemia policlonal e a presença de monócitos e neutrófilos contendo pigmento malárico. (WICKRAMASINGHE; ABDALLA, 2000; BUFFET *et al.*, 2011).

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

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

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

O mecanismo de falência renal ainda não está totalmente elucidado, porém há hipóteses que indicam alterações na microcirculação causada pela citoaderência das hemácias. Desse modo, o aumento de expressões de fatores de adesão celular induzíveis na parede do vaso e a produção de “rosetas” interferem no fluxo sanguíneo na medida em que as células infectadas sofrem remodelamentos e aderem as células normais formando agregados celulares. Por conseguinte, ocorre à obstrução mecânica e a perda de fluidos por múltiplos mecanismos que provavelmente contribuem para o desencadeamento da falência renal (DAS, 2008; GOMES *et al.*, 2011).

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

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

As estratégias de controle da infecção estão baseadas no desenvolvimento de vacinas e medicamentos, assim como no avanço de políticas de erradicação do vetor, quimioprofilaxia e melhoria dos sistemas de saúde (Frason *et al.*, 2009). Dentre as principais drogas utilizadas para o tratamento da malária destaca-se a família das quinolinas formadas pelas 4- aminoquinolinas, as 8-aminoquinolinas e os álcoois quinolínicos que incluem drogas como a cloroquina, primaquina, quinina, mefloquina, lumefantrina (BRASIL, 2010) e a Artemisinina, sendo o principal agente antimalárico utilizado em tratamento de casos graves, porém a resistência desenvolvida pelo plasmódio inviabiliza sua utilização em muitos casos, além da elevada toxicidade ao organismo, que agrava o quadro de disfunção hepática e renal produzido pela patologia (ARIEY *et al.*, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2014).

2.5 Diagnóstico

O diagnóstico rápido, eficaz e preciso da malária é um desafio, não somente em regiões que possuem recursos limitados, mas também em países desenvolvidos e em áreas não

endêmicas onde os especialistas são raros e não consideram a malária como hipótese de diagnóstico. A rápida detecção do parasito, além de aliviar o sofrimento, diminui o risco de infecção para sociedade e direciona a escolha adequada para o tratamento. (TANGPUKDEE *et al.*, 2009; HEMINGWAY *et al.*, 2016).

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

2.6 Diagnóstico Clínico da Malária

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

2.7 Diagnóstico Laboratorial da Malária

O diagnóstico laboratorial da malária é realizado por diferentes técnicas, desde microscopia óptica do esfregaço sanguíneo utilizando sangue periférico corados com Giemsa ou outras técnicas de coloração, como teste quantitativo de buffy coat (QBC), teste de diagnóstico rápido (RDT) a exemplo do OPtiMAL, ICT, ParaHIT-f até métodos de diagnóstico molecular, como a reação em cadeia da polimerase (PCR). Os diferentes métodos possuem características peculiares e vantagens e desvantagens relacionados à sensibilidade, especificidade, precisão, custo, intensidade de trabalho e à presença do executor treinado (TANGPUKDEE *et al.*, 2009).

A microscopia usando esfregaço sanguíneo fino ou grosso em lâmina de vidro corado utilizando a coloração de Giemsa, Wright ou Field é o método considerado padrão ouro para

diagnóstico laboratorial da malária. A gota espessa do sangue periférico corada com Giemsa é considerado um teste de triagem para malária, já o esfregaço sanguíneo que forma um filme de sangue bem fino é utilizado para confirmação da espécie (TANGPUKDEE *et al.*, 2009).

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

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

O teste de diagnóstico rápido (RDT) para malária surgiu principalmente para suprir as deficiências das técnicas de microscopia, sendo uma técnica fácil de realizar aumentando o acesso ao diagnóstico sem requerer energia elétrica e um microscopista treinado. Hoje existem mais de 80 RDT's para malária e são disponibilizados gratuitamente em 88 países. A técnica baseia-se na detecção do antígeno da malária no sangue por imunocromatografia contendo anticorpos antimaláricos específicos. Os RDT's para malária em sua grande maioria contêm os "anticorpos panmaláricos" são anticorpos de detecção qualitativa da malária com as aldolase ou lactato desidrogenase (LDH) comuns para todas as espécies de *Plasmodium*. Há também testes rápidos específicos para a detecção do *P. falciparum* contendo anticorpos com a proteína histidinérgica 2 (HRP-2). Os desempenhos relatados pelos RDT's para detecção de malária são excelentes, principalmente por estender o diagnóstico em áreas remotas, no entanto, em áreas endêmicas já foram relatados grandes variações de sensibilidade por apresentar limitações em

detectar infecções com baixo nível de parasitemia, ou os estágios hepático de *P. vivax* e *P. ovale* levando a OMS recomendar a utilização em conjunto com outros métodos como a microscopia para certificar os resultados (WHO,2015) (TANGPUKDEE *et al.*, 2009; SINGH; DANESHVAR, 2013; HEMINGWAY *et al.*, 2016).

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

2.8 Drogas Antimaláricas

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

Os fármacos antimaláricos devem atuar em todas as fases do ciclo de vida do parasito, no entanto, em sua maioria atua sobre o ciclo eritrocítico, ou seja, na fase esquizogônica em que apresenta maior susceptibilidade as drogas, sobretudo, aos derivados da artemisinina. Podem ser classificados pelos seus grupos químicos em: arylaminoálcoois, as 4-aminoquinolinas, 8-aminoquinolinas, peróxidos de lactona sesquiterpênica, naftoquinonas e antibióticos. (OLIVEIRA *et al.*, 2014; CUI *et al.*, 2015; SHI *et al.*, 2015). Ou pelos seus mecanismo de ação, em dois grandes grupos: Alcalóides derivados da cinchona que interferem no metabolismo da glicose e na habilidade do parasito na degradação da hemoglobina, impedido a obtenção de energia ou provocando a sua intoxicação com altos níveis de ferriprotoporfirina-IX. É o segundo grupo que abrange as perimidinas e biguanidas que interferem na síntese do DNA e de aminoácidos através da interferência da síntese do ácido tetra-hidrofólico (FRANÇA *et al.* 2008).

A quinina faz parte da família das quinolinas é a medicamento mais antigo utilizado no tratamento da malária, atua como esquizotocida eritrocítico rápido impedindo a formação dos gamétocitos nas espécies *P. vivax*, *P. ovale* e *P. malariae*. É usada com frequência apenas em casos de malária grave por causa de sua baixa tolerabilidade e efeitos adversos que impossibilitam a adesão ao tratamento nos casos de malária não complicada. (CUI *et al.*, 2015).

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

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

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

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

Além de tudo, em cinco países do Sudeste Asiático já detectaram parasitas resistentes à cloroquina, quinina, mefloquina, artemisinina e as ACTs. Dentre os fatores relacionados estão a expressão de genes que induzem a síntese de proteínas com propriedades pró-oxidantes antagonizando os efeitos dos fármacos antimaláricos. Portanto, a expansão de plasmódios

resistente a artemisinina pode ser catastrófica na medida em que ocorre a propagação da resistência para áreas como a África Subsaariana ou no subcontinente indiano, onde as taxas de transmissão, morbidade e mortalidade são elevadas (FAIRHURST; DONDORP, 2016; HEMINGWAY *et al.*, 2016). A resistência do *Plasmodium* aos medicamentos não é o único fator que preocupa em relação à malária, a plasticidade do mosquito que já apresenta resistência aos inseticidas é um agravo para a disseminação da malária. Na África já foi identificado a resistência do mosquito a dois ou mais inseticidas (HEMINGWAY *et al.*, 2016).

2.9 Derivados da Artemisinina

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

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

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

O catabolismo de componentes celulares pelo parasito leva hemácias infectadas a apresentarem alto nível de estresse oxidativo, visto que, ocorre o aumento de radicais livres intracelulares e peroxidação lipídica. Dessa maneira, hemácias infectadas pelo parasito apresentam suscetibilidade à artemisinina e derivados, uma vez que, são bioativados na presença de compostos redutores, que podem doar elétrons, como o ferro (SHI *et al.*, 2015).

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

2.10 Plantas Medicinais

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

A OMS estipula que 80% da população mundial utilizam plantas medicinais como recurso terapêutico, no entanto a grande maioria dessas plantas é utilizada sem nenhum conhecimento científico comprovado, sendo necessária a realização de estudos que comprovem a eficácia terapêutica, a toxicidade, contraindicações e interações desses produtos naturais. (FIRMO *et al.*, 2012; MELO *et al.*, 2017).

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

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

Dentre as doenças tratadas por plantas medicinais estão as parasitárias. Melo *et al.*, (2017) identificou 67 espécies de plantas usadas para o tratamento de parasitose, distribuído em 43 famílias, sendo *Leguminosae*, *Meliaceae*, *Solanaceae*, *Compositae* e *Euphorbiaceae* as mais

citadas no estudo. A malária foi a doença parasitária com maior número de indicações de plantas medicinais para o tratamento.

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

2.11 *Libidibia ferrea*

Segundo a taxonomia, *Caesalpinia ferrea* var. *parvifolia* (Mart. ex Tul.) L. P. Queiroz, possui como sinonímia botânica o nome de *Libidibia ferrea* Mart. ex Tul. var. *ferrea*, é uma árvore que pertence à família Leguminosae-Caesalpinioideae (Libidibiaceae) que cresce em todo o Brasil, sendo encontrada, principalmente, na região Norte e Nordeste (LORENZI, 2002). É conhecida vulgarmente como jucá ou pau-ferro, este último devido à rigidez do seu lenho, além dos nomes indígenas ibirá-obi, imirá-itá, muirá-obi e muiré-itá (LORENZI, 2002; FREITAS, 2012).

Possui flores amarelas pequenas e em cachos; frutos de cor marrom escura, lisos, duros e aromáticos do tipo legume (vagem), com sementes também escuras; folhas compostas, com folíolos pequenos; altura de 10-15 m, com tronco curto de 40-60 cm de diâmetro apresentando manchas claras, características que permitem seu fácil reconhecimento (Figuras 1 e 2). Esta planta floresce a partir de novembro, prolongando-se até janeiro, tendo anualmente uma alta produção de frutos que amadurecem em julho-agosto (GALDINO, 2008; CAVALHEIRO *et al.*, 2009; FREITAS, 2012; SILVA *et al.*, 2017).

Libidibia ferrea é uma espécie economicamente importante, devido a uma multiplicidade de usos visto seu potencial medicinal; como planta ornamental, na construção civil, além de ser utilizado no Nordeste como forrageira (FREITAS, 2012).

A cultura da região amazônica dispõe de inúmeros produtos e princípios ativos referendados pela ciência, em virtude do seu extenso uso na medicina popular, sendo que a *Libidibia ferrea*, popularmente conhecida como “jucá” ou “pau-ferro”, é uma espécie indicada para tratar diversas afecções de saúde (LORENZI, 2002), a partir de sua casca, folhas e frutos são muito usadas em preparações como chás, infusões e emplastos, lhe sendo atribuídas propriedades para tratamento de afecções bronco-pulmonares, diabetes, reumatismo, câncer,

distúrbios gastrintestinais, diarreia, além do tratamento de feridas e contusões. (OLIVEIRA, 2010; PAIVA et al., 2015; SOUZA et al., 2017).

O jucá (*Libidibia ferrea*), tem sido muito investigado *in vitro* e *in vivo* do ponto de vista de suas diversas propriedades biológicas apresentando vários componentes já isolados, dotados de propriedades larvicida (CAVALHEIRO et al., 2009), anti-inflamatória, anticancerígena, anti-úlceras, antioxidantes, antimicrobiana analgésica e cicatrizante, o que apoia sua utilização medicinal em algumas doenças de natureza inflamatória, cancerígena, ulcerativas, oxidantes, imunodepressivas, microbianas, fungicida e lesões que precisem de cicatrização (PEREIRA, 2011; FERREIRA, 2012; CRISCI, 2013; OLIVEIRA et al., 2014; MAGALHÃES et al. 2015; PAIVA et al., 2015; HENRIQUE, 2015).

Encontram-se em menor escala estudos sobre sua composição fitoquímica, destacando-se entre os componentes já isolados os compostos fenólicos, flavonoides e taninos (KOBAYASHI et al. 2015 e MAGALHÃES et al., 2015). A presença de flavonoides confere características anti-inflamatórias ao extrato, taninos conferindo ação antisséptica, adstringente e cicatrizante, e cumarinas responsáveis pela ação antibacteriana e antifúngica (GONZALES, 2005; LOGUERCIO et al., 2005; OLIVEIRA, 2010; PAIVA et al., 2015 e MAGALHÃES et al., 2015).

Análises fitoquímicas revelaram ainda a presença de saponinas, ácidos orgânicos, açúcares redutores, fenóis, taninos, sesquiterpenolactonas e antraquinonas, onde a maioria dos autores, em estudos sobre atividade cicatrizante de plantas medicinais, sugere que os taninos são os responsáveis pela ação farmacológica, em virtude de suas propriedades adstringentes e antioxidantes, possivelmente explicando a ação desses metabólitos nos processos de cicatrização de feridas (KOBAYASHI et al., 2015; MAGALHÃES et al., 2015).

2.12 Atividades Biológicas e Uso Do Jucá

Os princípios e medicamentos fitoterápicos começam a ganhar cada vez mais espaço no tratamento veterinário, demonstrado através do aumento da pesquisa de produtos naturais para auxiliar no tratamento de doenças, e entre as plantas estudadas, encontra-se o jucá (*Libidibia ferrea*), que em face de sua importância etnomédica, o Ministério da Saúde brasileiro incluiu esta espécie na Lista Nacional de Plantas Medicinais importantes para o Sistema Único de Saúde (FREITAS, 2012).

Pesquisas no estado do Rio Grande do Norte, informam que o pó da casca da *Libidibia ferrea* é utilizado pela população para tratamento de feridas cutâneas, diferentemente do que

ocorre na região Amazônica onde o fruto da planta é utilizado empiricamente como cicatrizante, sendo inclusive comercializado em feiras na forma de frutos secos ou mesmo em formulações contendo álcool, OLIVEIRA et al., (2014). ALVES e SANTOS (2014) realizou levantamento acerca das plantas medicinais mais utilizadas pela população da Caatinga, co-relacionando dados etnobotânicos com estudos científicos e concluiu que o potencial uso farmacológico desta espécie está comprovado pelas inúmeras pesquisas realizadas, sejam elas *in vitro* e/ou *in vivo* sobre suas ações antidiabética, antiulcerogênica e anti-inflamatória.

Em inventário das plantas medicinais de uma comunidade rural maranhense, analisando o valor de uso e a importância relativa das espécies, assim como o consenso dos informantes quanto às doenças tratadas, o jucá (*Libidibia ferrea*) foi classificado entre as espécies de maior uso, sendo associados a cicatrização, dor de dente, alergia, inflamação no útero e trombose (VIEIRA et al., 2015).

Estudos fitoquímicos nos extratos aquoso, etanólico e metanólico dos frutos de jucá (*Libidibia ferrea*) evidenciaram a presença de taninos pirogálicos, flavonóis, flavanonas, catequinas e alcalóides para todos os extratos analisados. Em testes preliminares para prospecção fitoquímica dos extratos foram descritos a presença de bioativos importantes como ácido gálico e elágico pertencentes ao grupo de taninos com propriedades antioxidantes que potencializam os efeitos cicatrizantes dos extratos de jucá em camundongos. (CUNHA et al., 2012). A presença de flavonoides nos extratos de jucá (*Libidibia ferrea*) confere características anti-inflamatórias, os taninos conferem ação antisséptica e cicatrizante, e as cumarinas são responsáveis pela ação antibacteriana e antifúngica do extrato (PAIVA et al., 2015).

Ensaio sobre as atividades biológicas e enzimáticas do extrato aquoso de sementes do jucá (*Libidibia ferrea*) para atividade antibacteriana frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, não mostraram atividade antibacteriana nem antifúngica (CAVALHEIRO, 2009), assim como na avaliação da cicatrização de feridas cutâneas abertas de ratos Wistar tratadas com pó das cascas do fruto do jucá (*Libidibia ferrea*), em pomada nas concentrações à 20% e de 50% não apresentou resultados satisfatório como cicatrizante (FERNANDES et al., 2014). Já a ação fúngica contra *Candida albicans* foi detectada em estudo *in vivo* em baixas concentrações de extratos bruto da casca do jucá (FERREIRA, 2012).

Foi demonstrada a atividade moduladora do extrato alcoólico da entrecasca e de frutos frescos quando combinados com alguns antimicrobianos contra algumas linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, sugerindo a possibilidade de utilização do extrato dessa planta na terapêutica antimicrobiana no combate a multirresistência. (HENRIQUE, 2016).

Pesquisas sobre a atividade cicatricial do extrato aquoso da vagem e da casca do jucá em lesões cutâneas de asininos (*Equus asinus*), demonstrou que o uso de extratos aquosos da vagem e da casca do jucá a 30% para tratamento de ferida dérmica de asininos, não foram suficientes para interferir significativamente no processo de cicatrização da pele desses animais (OLIVEIRA et al., 2014), demonstrando nas situações acima que talvez os princípios ativos da planta não sejam extraídos em soluções aquosas, uma vez que há relato dessas ações apenas nos extratos alcoólicos em frações do caule e do fruto (OLIVEIRA, 2010; MAGALHÃES et al., 2015; PAIVA et al., 2015; HENRIQUE, 2016).

Em avaliação do extrato hidroalcoólico da casca de jucá (*Libidibia ferrea*) ficou demonstrada a eficiência no combate aos micro-organismos, *S. aureus*, isolados do leite de cabras, através do uso do extrato hidroalcoólico bruto de jucá. Desta forma, dentre as alternativas para a diminuição do uso descontrolado de antibióticos, surge a pesquisa dos extratos naturais com capacidade antimicrobiana (PAIVA et al., 2015).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

- Avaliar a atividade anti-plasmodial *in vitro* do extrato hidroalcolico de *Libidibia ferrea* Mart. ex Tul. var. ferrea (EHJ).

3.2 Específicos

- Caracterizar quimicamente os constituintes do EHJ.
- Avaliar a citotoxicidade do EHJ por MTT.
- Avaliar atividade anti-plasmodial *in vitro* do EHJ.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material botânico

O Jucá foi utilizado a partir de um extrato hidroalcoólico de suas vagens. Como matriz foi utilizado exemplar adulto da espécie *Libidibia férrea* localizado na área urbana de Santarém – PA, o qual já foi identificado e catalogado como FABACEAE - *Libidibia ferrea*. (Exsicata HSTM010436, herbário HSTM/UFOPA). A preparação do extrato hidroalcoólico de *Libidibia ferrea* foi realizada conforme AMÉRICO et al. (2020) adaptada de KOBAYASHI et al., (2015). Os frutos (1,5 kg) foram coletados a partir de um exemplar adulto da espécie, higienizados com álcool 70° Gl e deixados em temperatura ambiente para a primeira secagem. Após 48 horas os frutos foram colocados em estufa de circulação de ar forçado microprocessada a 40°C, durante o período de 72h para secagem. Em seguida, as vagens foram trituradas em moinho de facas. O material triturado foi colocado para maceração em álcool 96° Gl, na proporção de 5 litros de álcool para 1 kg de planta, durante 7 dias. Em seguida, o macerado foi filtrado e a tintura extraída por meio de rotaevaporador. O extrato obtido foi então liofilizado e congelado até sua utilização nas análises.

4.2 Análise cromatográfica

A análise da composição química do EHJ foi realizada no Centro de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrônomicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). O equipamento utilizado foi o cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massa Agilent, modelo HP-6890 equipado com um detector seletivo de massas, com coluna capilar HP-5MS (30m x 0,25mm x 0,25µm) nas seguintes condições: temperatura do injetor = 220°C, coluna = 60°C, taxa de aquecimento de 3°C/min até 280°C (20 min) e detector = 250°C. Foi utilizado hélio como gás de arraste numa vazão de 1mL/min. Os espectros de massa obtidos foram comparados com a biblioteca eletrônica do equipamento (NIST-05) e com a bibliografia Adams (2007).

4.3 Solubilização do composto para testes com atividade biológica

Para o preparo da solução estoque foi utilizado o solvente dimetilsulfóxido (DMSO) resultando numa concentração inicial de 10000 µg/mL. Essa solução é mantida em geladeira a aproximadamente 4°C. No dia da realização dos testes de citotoxicidade foram realizadas diluições utilizando RPMI, resultando nas seguintes concentrações a partir da solução estoque: 1000 µg/mL, 100 µg/mL, 10 µg/mL, 1 µg/mL e 0,1 µg/mL. A partir dessas concentrações foram

realizadas diluições seriadas, onde a faixa de concentração final dos compostos na placa de células foram de 100 µg/mL, 10 µg/mL, 1 µg/mL, 0,1 µg/mL e 0,01 µg/mL. O volume final da concentração de DMSO foi de 0,01%.

4.4 Ensaios Biológicos

4.4.1 Cultivo das linhagens celulares humana

A linhagem celular humana utilizada para análise de toxicidade foi WI-26VA4 (fibroblasto pulmonar ATCC CCL-75). Essa linhagem faz parte do banco de células animais do Serviço de Biologia Celular (SBC) da Fundação Ezequiel Dias (FUNED) em Belo Horizonte - Minas Gerais que possui um laboratório com certificação ABNT NBR ISO9001/2008 e se destaca no suporte ao desenvolvimento de projetos de pesquisa que requerem o acesso às técnicas de cultivo de células e tecidos. Consolidando-se como referência no cultivo de células animais.

As células foram cultivadas a partir de ampola crio preservada, as mesmas foram descongeladas a 37°C, seu conteúdo transferido para um tubo de 15mL, com 10mL de meio RPMI 1640. As células foram centrifugadas a 1200rpm por cinco minutos, o sobrenadante descartado e o sedimento ressuspendido em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal (SBF) inativado pelo calor (meio completo). As células foram transferidas para garrafas plásticas de cultivo celular tratada para promover a adesão celular, T75 (75cm²) 10mL (Corning Costar Inc. EUA) e mantidas como monocamadas a 37°C em estufa (Thermo electron co. EUA) com uma atmosfera úmida de 5% de CO₂. O meio de cultura é substituído a cada 48 horas de incubação. Morfologia celular e formação da monocamada foram observadas ao microscópio invertido em aumento de 100x (modelo Olympus. CKX 41). O congelamento dessas células foi realizado em ampolas de criopreservação com uma solução contendo meio RPMI completo com 5% de DMSO e estas são mantidas em nitrogênio líquido no banco de criopreservação (CryoPlus 7405 / Thermo Scientific. EUA). Após confluência de 80% da cultura na garrafa T75 as células foram repicadas ou utilizadas nos ensaios de citotoxicidade (PATRA et al., 2011; PEREIRA et al., 2012).

4.4.2 Ensaios de Citotoxicidade

O teste de químico-sensibilidade mais utilizado na prática pré-clínica é o teste MTT. Referente à sigla do reagente utilizado na avaliação final, ou seja, 3-(4,5 dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil-2H tetrazolato de bromo (MATSUZAKI et al., 2006). Este teste consiste na avaliação colorimétrica rápida do crescimento de linhagens celulares *in vitro*. O ensaio baseia-se na redução do sal tetrazolato pela enzima succinato desidrogenase presente na mitocôndria das células eucarióticas viáveis, formando um cristal insolúvel em água conhecido como cristal de formazan (CARMICHAEL et al., 1987; PARK et al., 1987). Ao solubilizar o cristal com um solvente orgânico, adquire uma coloração violácea que é avaliada por espectrofotometria.

Após adquirir 80% de confluência as células foram tripsinizadas com 1,5mL da enzima tripsina (1:250 Sigma), incubadas a 37°C por cinco minutos, ressuspensas em 10mL de meio completo e centrifugadas a 1200rpm por cinco minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensado com meio completo. As células foram distribuídas em microplacas de 96 poços a uma densidade de 4x10⁵ células/100µl por poço e incubadas em estufa de CO₂ a 37°C por 24h para a adesão das mesmas à placa. Após esse período de adesão o meio foi retirado, adicionado 180 µl de meio RPMI suplementado com 1% de SFB e foram adicionados 20µl de composto diluído em meio RPMI contendo diferentes concentrações do composto testados a partir das diluições iniciais, o composto foram adicionados em triplicata. As placas foram incubadas por mais 48 horas. No final do período de tratamento foram adicionados 100µl/poço de uma solução brometo 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazol (MTT) (Sigma), o sal tetrazólico, na concentração de 0,5mg/mL em RPMI 1640 sem fenol (DENIZOT; LANG, 1986). Após três horas de incubação na estufa de CO₂ a 37°C no escuro com o MTT, o sobrenadante foi aspirado e os cristais de formazan foram dissolvidos em 50µl/poço de DMSO e mantidos a 37°C durante 10 minutos. A absorbância por poço foi medida a um comprimento de onda de 550nm utilizando o Gen5 (Data Analysis Software -Bio-Tek). Os dados foram analisados a partir de experimentos independentes. A dose letal mínima que inibe em 50% (IC₅₀) o crescimento das células na presença do composto teste foi determinado em comparação com células cultivadas sem a presença de composto (considerada 100% de crescimento). Os cálculos foram realizados a partir de curvas de concentração dose-resposta sigmoidal usando Software OriginPro versão 8.0 (OriginLab Corporation. Northampton. MA. USA) (PATRA et al., 2011; PEREIRA et al., 2012).

4.4.3 Cultivo *in vitro* de *Plasmodium spp*

Atualmente, a única espécie capaz de ser cultivada continuamente *in vitro* é o *Plasmodium falciparum*, pelo fato da mesma ter a capacidade de invadir eritrócitos jovens e maduros (TRAGER; JENSEN, 1976). O *P. vivax* invade apenas reticulócitos (eritrócitos jovens), sendo esse um dos fatores para que o cultivo contínuo não seja satisfatório (MORENO-PÉREZ; RUÍZ; PATARROYO, 2013). Portanto, o modelo mais empregado na triagem de novos compostos com ação anti-plasmodial tem como foco o *P. falciparum* nos testes *in vitro* (AGUIAR et al., 2012).

4.4.4 Cultivo *in vitro* das fases intraeritrocitárias de *Plasmodium falciparum*

Os parasitos da cepa W2 (cloroquina-resistente) foram cultivados em hemácias humanas *in vitro* sob condições estabelecidas por TRAGER & JENSEN (1976). Os parasitos foram cultivados em garrafas de cultura com hematócrito a 5% usando meio de cultivo completo (RPMI 1640 suplementado com 25mM de HEPES, 21mM de bicarbonato de sódio, 300µM de hipoxantina, 11mM de glicose, 40µg/ml de gentamicina e 10% (v/v) de plasma humano inativado pelo calor). As placas foram mantidas à 37°C e a concentração adequada de oxigênio foi obtida pela combustão de uma vela, sendo realizadas trocas diárias de meio. A parasitemia foi monitorada diariamente em esfregaços, corados com Giemsa, ao microscópio óptico (1000x).

4.4.5 Determinação da parasitemia

Foram confeccionados esfregaços sanguíneos de cultivo, secos ao ar, fixados com metanol e corados com solução recém diluída de Giemsa na proporção de três gotas para cada 1mL de solução salina tamponada pH 6,8. Após 10 minutos, as lâminas foram lavadas em água corrente, secas ao ar e examinadas ao microscópio óptico com objetiva de imersão (1000x). A parasitemia foi determinada através da contagem do número de hemácias infectadas. Para parasitemias maiores que 5%, 1000 hemácias foram contadas. No caso de infecções muito baixas, menores que 5%, foram contadas 6000 hemácias. Nesse caso, a avaliação foi feita pela estimativa do número total de hemácias por campo microscópico em um total de 50 a 100 campos, estimando-se o número de hemácias infectadas. A parasitemia foi expressa em percentagem de hemácias parasitadas.

4.4.6 Sincronização do cultivo de *Plasmodium falciparum*

Os parasitos de cultivo foram sincronizados pelo método do sorbitol (LAMBROS; VANDERBERG, 1979). Os cultivos com predomínio de formas jovens (anéis), obtidas logo após a sincronização, foram utilizadas nos ensaios quimioterápicos. Após a adição de 10 ml de sorbitol, os parasitos foram mantidos nas mesmas condições ambientais do cultivo (37 °C e 5% CO₂) por 10 min. Após o tempo de ação do sorbitol, o conteúdo foi centrifugado em tubo falcon a 2500 RPM por 5 min e o volume do sedimento foi utilizado para determinação do hematócrito. O líquido sobrenadante foi removido e as hemácias foram ressuspensas com meio de cultura RPMI com o hematócrito ajustado para 2%.

4.4.7 Testes esquizotocidas *in vitro* com *Plasmodium falciparum* utilizando o ensaio antimalárico com SybrGreen I (SMILKSTEIN et al., 2004)

Culturas sincronizadas do *P. falciparum* com 0,5% de parasitemia em estágio de anel e 2% de hematócrito foram distribuídas em placa de 96 poços (180µL por poço). O composto testado foi adicionado (20µL) à placa-teste, em triplicata, e em diferentes concentrações seriadas de 50 a 0,20µg/mL. Os poços controle continham hemácias infectadas sem adição do composto teste (controle negativo). O antimalárico padrão, cloroquina, foi testado em paralelo em todos os experimentos realizados, em diluições seriadas de 500 a 2,0ng/mL (controle positivo). Em seis poços foram adicionados 180µL de eritrócitos não parasitados para a exclusão da autofluorescência dos mesmos.

As placas-teste foram incubadas a 37°C por 48h. Após a incubação, o sobrenadante foi removido e 150µL de PBS 1X foram adicionados em cada poço. As placas foram centrifugadas a 700g por 5 minutos e o sobrenadante novamente removido e 120µL de tampão de lise com Sybrsafe (20mM TRIS-base, 5mM EDTA, 0,008%p/v Saponina, 0,08%v/v Triton X-100, 0,2µL/mL Sybr safe) foram adicionados.

Após a lise dos eritrócitos, os poços foram homogeneizados e 100µL do conteúdo de cada poço foram adicionados a uma nova placa contendo 100µL de PBS. A leitura da fluorescência foi realizada após a incubação por 30 minutos ao abrigo da luz em fluorímetro com excitação de 484nm e emissão de 535nm.

As hemácias parasitadas (iRBC) emitem maior fluorescência que as hemácias normais (RBC), sendo a resposta dos composto testes inversamente proporcionais à emissão da fluorescência, comparada aos poços sem adição de composto.

4.4.8 Índice de Seletividade

Um importante critério na pesquisa de composto ativo como potencial terapêutico é determinar a ausência de efeitos tóxicos nas células do hospedeiro, através do índice de seletividade (IS), que mede o quanto o composto é ativo contra o parasito sem causar danos à viabilidade das células de mamíferos. Sendo assim, quanto maior for a proporção, maior será a seletividade do composto para as células do parasito. O índice de seletividade é calculado de acordo com a fórmula abaixo.

$$IS = \frac{\text{IC50 do composto em linhagem de células de mamíferos}}{\text{IC50 do composto em linhagem parasitária}}$$

4.4.9 Avaliação da atividade Hemolítica

Sangue fresco (5 ml) foi colhido em tubo com EDTA e centrifugado a $1000 \times g$ durante 5 min a 4°C . O sobre nadante foi retirado, o pellet com as células vermelhas do sangue (RBC) foi lavado cinco vezes com solução salina 0,9% estéril e depois resuspensas na mesma solução para obter uma solução de hemácias 2% (v/v). O composto-teste foi diluído em solução de DMSO a 1% e testado nas seguintes concentrações: 2000 a 15,6 $\mu\text{g/ml}$, em 8 diluições seriadas (1:2) testados em triplicata e adicionado 100 μL da suspensão de hemácias a 2% (v/v) em cada poço. As suspensões resultantes foram incubadas sob agitação durante 60 minutos a 37°C . Após a incubação, as amostras foram centrifugadas durante 10 min a 1500 g. Os sobrenadantes foram transferidos para placas de 96 poços e a liberação de hemoglobina foi medida por absorbância a 450 nm, utilizando o leitor multiplacas BioTek Synergy HT. 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%.

O percentual de hemólise foi determinado pela seguinte equação: $[(\text{Abs}450\text{nm tratados amostra} - \text{Abs}450\text{nm não tratada}) / (\text{Abs}450\text{nm}1\% \text{ Triton X-100} - \text{Abs}450\text{nm não tratada})] \times 100$ (AHMAD et al., 2010).

4.5 Análise estatística

A análise estatística foi realizada no programa Graph Pad Prism 5.0 (Prim software, Irvine, CA, USA). O resultado foi expresso como a média +/- desvio padrão. Análise de variância (ANOVA two-way) foi aplicada para avaliar a significância estatística das diferenças entre os grupos de estudo. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado como critério para significância estatística.

5 RESULTADOS

A identificação e caracterização de moléculas farmacologicamente ativas é uma necessidade que move esforços nos mais diversos âmbitos da pesquisa científica no mundo todo. A aplicabilidade de tais moléculas pode ser muito variável, porém, o objetivo principal do processo de desenvolvimento de medicamentos é a obtenção de moléculas que tenham grande eficiência e especificidade frente ao alvo terapêutico, baixos custos e ausência ou diminuição de riscos aos potenciais usuários (BHATNAGAR; KIM, 2010). Sendo relevante o desenvolvimento racional de fármacos, abordagem deste estudo.

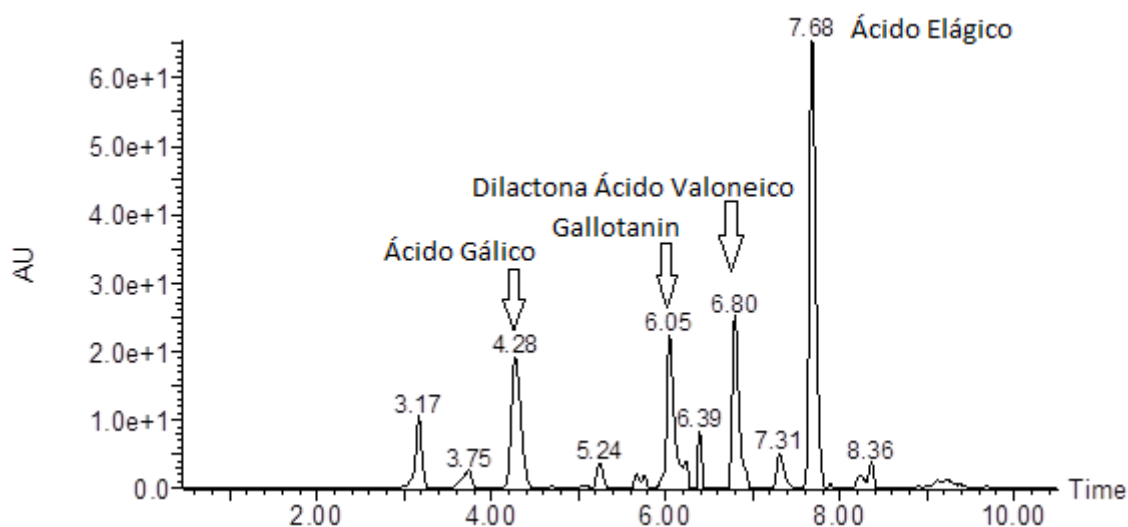
O aumento da resistência aos medicamentos atuais faz com que seja cada vez mais importante compreender o mecanismo de ação de compostos com ação para doenças parasitárias com impacto social e econômico. Este conhecimento auxilia na triagem de compostos bioativos com características farmacodinâmicas e/ou farmacocinéticas determinadas (SKINNER-ADAMS et al., 2016). Para tanto, as metodologias empregadas neste estudo, tem como principal objetivo a caracterização de potenciais alvos. Estes dados e discussões permitem inferir a importância do presente estudo.

5.1 Análise cromatográfica do EHJ

O estudo fitoquímico do extrato hidroalcoólico de *Libidibia ferrea* resultou na identificação dos seguintes compostos: ácido elágico (tr 7.68 min), dilactona ácido valoneico (tr 6.8 min), gallotannin (tr 6.05 min) e ácido gálico (tr 4.28 min) (figura 1).

Figura 2: Cromatograma HPLC-DAD do extrato hidroalcoólico de *Libidibia ferrea*. AU:

Absorbância.



A quantificação dos compostos identificou 78,1% dos constituintes da amostra, sendo o ácido elágico o composto majoritário (tabela 1).

Tabela 1: Composição química do extrato hidroalcoólico de *Libidibia ferrea*.

tr (min)	Identificação	Rel. %
4,28	ácido gálico	14,75
6,05	gallotannin	15,19
6,8	dilactona ácido valoneico	13,89
7,68	ácido elágico	34,27
TOTAL:		78,1

Tr: tempo de retenção; Rel.%: fração em porcentagem da área total integrada para o cromatograma.

5.2 Atividade anti-plasmodial e citotoxicidade

Os valores do efeito antimalárico e citotóxico que correspondem à metade da concentração máxima inibitória (IC₅₀) foram determinados para o extrato hidroalcoólico de Jucá. Estes foram determinados a partir do teste de citotoxicidade, utilizando linhagem de fibroblastos de células humanas (WI-26-VA4 # ATCC) e o ensaio antimalárico com SybrGreen I contra a cepa W2 do *P. falciparum* (cloroquina resistente). Além dos controles citados realizou-se a determinação para os antimaláricos padrões (cloroquina e artemeter). Os experimentos foram realizados em triplicata.

A citotoxicidade do extrato hidroalcoólico de Jucá foi avaliada contra uma linhagem de fibroblastos de células humanas (WI-26-VA4 # ATCC). O teste utilizado consiste em um método colorimétrico (MTT - brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]), que tem por objetivo avaliar a viabilidade celular. Nos testes realizados, a citotoxicidade foi registrada como a porcentagem de redução na absorbância. O extrato hidroalcoólico de Jucá não apresentou atividade citotóxica com valor de IC₅₀ superior a 100 µg/ml (Tab. 1).

Na determinação do IC₅₀ por teste anti-plasmodial o valor foi de 11,10 µg/ml. Além disso, obteve-se o índice de seletividade (SI), que corresponde à relação entre as atividades citotóxicas e anti-plasmodial do extrato hidroalcoólico de Jucá (Tab. 1).

Tabela 2: Resultados in vitro para a atividade anti-plasmodial (IC₅₀) do extrato hidroalcoólico de Jucá contra a cepa W2 de *P. falciparum*, IC₅₀ na linhagem celular humana WI-26-VA-4 e índice de seletividade do extrato.

Compostos	IC ₅₀ (µg/mL) ± DP*		
	<i>P. f</i> (W2)	WI-26-VA4	SI
Extrato etanólico de Jucá	11,10 ± 1,13	>100	9
Cloroquina	0,21 ± 0,13	>100	476
Artemeter	0,01 ± 0,28	>100	10000

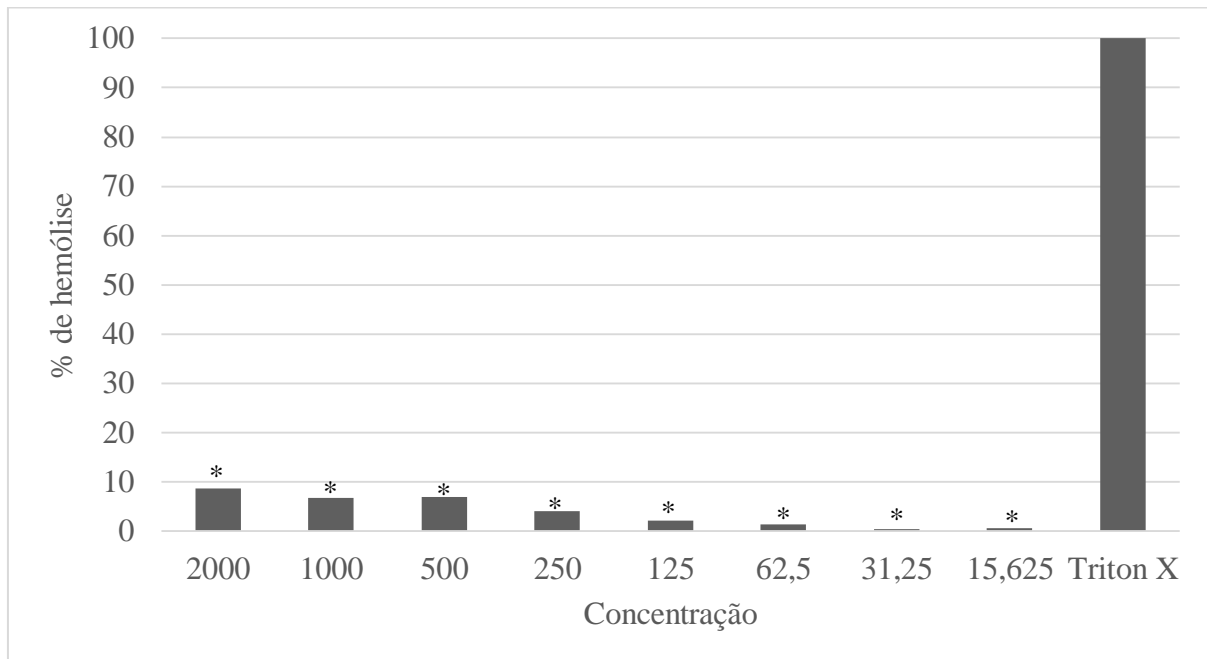
IC₅₀: Metade da concentração máxima inibitória; DP: Desvio Padrão; *P. f* (W2): *Plasmodium falciparum* cloroquina resistente, WI-26-VA4: Fibroblastos de células humanas; SI: Índice de seletividade.

5.3 Atividade Hemolítica

O EHJ apresentou hemólise de 8,68% em concentração de 2000 µg/ml, 6,71% em concentração de 1000 µg/ml, 6,97% em concentração de 500 µg/ml, 4,07% em concentração de 250 µg/ml, 2,13% em concentração de 125 µg/ml, 1,34% em concentração de 62,5 µg/ml e 0% nas concentrações de 31,25 µg/ml e 15,62 µg/ml. Todas as concentrações apresentaram diferença significativa em comparação ao grupo controle positivo.

Gráfico 1: Capacidade hemolítica do EHJ em diferentes concentrações. *Diferenças

estatisticamente significativa ($p < 0,05$).



6 DISCUSSÃO

A identificação e caracterização de moléculas farmacologicamente ativas é uma necessidade que vem movendo esforços nos mais diversos âmbitos da pesquisa científica no mundo todo. A aplicabilidade de tais moléculas pode ser muito variável, porém, o objetivo principal do processo de desenvolvimento de medicamentos é a obtenção de moléculas que tenham grande eficiência e especificidade frente ao alvo terapêutico, baixos custos e ausência ou diminuição de riscos aos potenciais usuários (BHATNAGAR; KIM, 2010). Sendo relevante o desenvolvimento racional de fármacos, em que se utiliza de ensaios *in silico* e *in vitro*, abordagem deste estudo.

O aumento da resistência aos medicamentos atuais faz com que seja cada vez mais importante compreender o mecanismo de ação de compostos com ação para doenças parasitárias com impacto social e econômico. Este conhecimento auxilia na triagem de compostos bioativos com características farmacodinâmicas e/ou farmacocinéticas determinadas (SKINNER-ADAMS et al., 2016). Para tanto, as metodologias empregadas neste estudo, tem como principal objetivo a determinação do mecanismo de ação de potenciais alvos derivados de alcaloides.

A determinação do mecanismo de ação, necessita da aplicação de novas estratégias. Permitindo com isso, não somente testar os compostos, e sim escolher os mais ativos e eficazes em todos os testes, *in vitro* como *in vivo*. Exigindo um delineamento contínuo em novos medicamentos descritos com perfil de produtos (BURROWS et al., 2017). Além disso, reduzir o impacto das doenças infecciosas que afetam a população mundial exige esforços colaborativos. A qualidade dos compostos químicos para tais projetos é um fator que pode influenciar na probabilidade do sucesso clínico. Para tanto, Katsuno e colaboradores apresentam os critérios relevantes nas pesquisas envolvendo doenças infecciosas (KATSUNO et al., 2015) os quais foram seguidos e analisados neste trabalho.

Os principais critérios de verificação e validação para antimaláricos, definidos pelo comitê coordenado pela fundação Global Health Innovative Technology (GHIT) foram guiados pelos requisitos específicos para a doença, considerando o produto-alvo e os perfis de candidatos. Os critérios foram divididos em: validação e atividade/mecanismo de ação (KATSUNO et al., 2015).

A cromatografia mostrou que os compostos majoritários são: ácido elágico (tr 7.68 min) com 34,27%, dilactona ácido valoneico (tr 6.8 min) com 13,89%, gallotannin (tr 6.05 min) com 15,19% e ácido gálico (tr 4.28 min) com 14,75%. Todos os compostos identificados são

classificados como tanino. AMÉRICO et al., (2020) utilizando cromatografia em camada delgada, identificou presença marcante de taninos hidrolisáveis e flavonoides em extrato de *Libidibia ferrea*. Estudos indicam que estes compostos fenólicos possuem baixa toxicidade e apresentam variadas atividades biológica como: tratamento de câncer, alzheimer, neuroinflamação, problemas gastrointestinais, inflamações e leishmaniose (AL-HALABI et al., 2011; AMORIM, 2014; FELDMAN et al., 2001; GILL, 2010; LIMA, 2014; SALAS et al., 2013; SANTANA, 2019).

Para a atividade/mecanismo de ação, os compostos devem ser testados de acordo com o estudo do ciclo de vida do plasmódio correlacionando as manifestações de malária. E os principais ensaios de acordo com o alvo devem ser realizados afim de assegurar a caracterização do potencial candidato a alvo (KATSUNO et al., 2015). O cultivo *in vitro* de cepas de *P. falciparum* tem sido um bom modelo de ensaio para triagem de novos compostos e para monitoramento da resistência a antimaláricos (WONG et al., 2010). Nesta metodologia o extrato etanólico de Jucá apresentou valor de IC₅₀ 11,10 µg/ml determinado para o *P. falciparum* (Tab. 1). ASSIS et al. (2020) obtiveram valores de IC₅₀ 1,21 µg/ml e IS 83 para cepa W2 de *P. falciparum* trabalhando com extrato de resíduo de *Cyperus articulatos*. SILVA et al. (2019) utilizando óleo essencial de *C. articulatus* obteve resultado não citotóxico para fibroblastos pulmonares humano por ensaio de viabilidade celular com MTT (IC₅₀ >100 µg/ml). Observou ainda que o IC₅₀ da cepa de *P. falciparum* W2 tratada com óleo essencial foi 1,21 µg/ml.

Conforme tabela 2 observa-se que o do extrato etanólico de Jucá não apresenta atividade citotóxica. E embora os toxicologistas prefiram as análises dos efeitos das substâncias em células de cultivo primário (SCHOONEN et al., 2005), a atividade citotóxica foi avaliada *in vitro* em linhagem celular, já que esta apresenta uma alternativa mais rápida e menos dispendiosa, pois possui uma taxa de crescimento maior.

A atividade hemolítica observada é tida entre baixa e média. MORENO et al., (2018) avaliando a atividade hemolítica de diferentes extratos vegetais, concluiu que o grau de hemólise foi classificado como baixo para tanchagem e bardana (5%) e médio para cavalinha, guaco e amora (25%) nas concentrações testadas. PASQUINI-NETTO et al., (2012) trabalhando com extrato de folhas de *Pterogyne nitens* classificou hemólises de até 10% como baixa ação hemolítica. Trabalhando com extrato vegetal, óleo essencial e hidrolato das plantas *Zingiber officinale Roscoe* e *Allium sativum*, DA PAZ et al., (2022) consideraram baixa atividade hemolítica em até 5,56 % de hemólise. Estes achados corroboram com a classificação dada a atividade hemolítica descrita neste estudo.

7 CONCLUSÃO

Munido dos dados obtidos neste estudo, podemos concluir que o EHJ não apresenta citotoxicidade e baixa atividade hemolítica.

Apesar do baixo índice de seletividade, o extrato mostrou atividade anti-plasmodial.

Podemos ainda inferir que a atividade biológica do extrato se deve aos taninos presentes em sua composição.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, A. C. C. et al. Antimalarial Activity and Mechanisms of Action of Two Novel 4-Aminoquinolines against Chloroquine-Resistant Parasites. **PLOS ONE**, v. 7, n. 5, p. e37259, 23 maio 2012.
- AHMAD, A. et al. Evolution of ergosterol biosynthesis inhibitors as fungicidal against *Candida*. **Microbial Pathogenesis**, v. 48, n. 1, p. 35–41, jan. 2010.
- AL-HALABI, R. et al. Gallotannin inhibits NFκB signaling and growth of human colon cancer xenografts. <http://dx.doi.org/10.4161/cbt.12.1.15715>, v. 12, n. 1, p. 59–68, 1 jul. 2011.
- AMÉRICO, Á. V. L. DOS S. et al. Efficacy of Phytopharmaceuticals from the Amazonian Plant *Libidibia ferrea* for Wound Healing in Dogs. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 7, p. 244, 12 jun. 2020.
- AMORIM, C. M. Desenvolvimento de sistemas de liberação nanoemulsionados mucoadesivos contendo ácido elágico para administração nasal visando o tratamento da doença de alzheimer. 2014.
- ARIEY, F. et al. A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. **Nature**, v. 505, n. 7481, p. 50–55, 2014.
- ASSIS, F. F. V. et al. Chemical Composition and In Vitro Antiplasmodial Activity of the Ethanolic Extract of *Cyperus articulatus* var. *nodosus* Residue. **Pathogens (Basel, Switzerland)**, v. 9, n. 11, p. 1–7, 1 nov. 2020.
- BHATNAGAR, I.; KIM, S. K. Marine Antitumor Drugs: Status, Shortfalls and Strategies. **Marine Drugs**, v. 8, n. 10, p. 2702, 2010.
- BORGES, C. DE S. et al. **Descrição morfológica da plântula e diásporos de *Caesalpinia ferrea* Mart.**, 2008.
- BURROWS, J. N. et al. New developments in anti-malarial target candidate and product profiles. **Malaria journal**, v. 16, n. 1, 13 jan. 2017.
- CALIXTO, J. B. et al. **Biological activity of plant extracts: Novel analgesic drugs.** **Expert Opinion on Emerging Drugs**, out. 2001.
- CARMICHAEL, J. et al. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric

assay: assessment of radiosensitivity. **Cancer research**, v. 47, n. 4, p. 943–946, 1987.

DA PAZ, I. P. et al. Toxicidade do extrato vegetal, óleo essencial e hidrolato das plantas *Zingiber officinale* Roscoe e *Allium sativum* L. / Toxicity of plant extract, essential oil and hydrolate of *Zingiber officinale* Roscoe and *Allium sativum* L. **Brazilian Journal of Development**, v. 8, n. 2, p. 14318–14329, 2022.

DELMACIA, G. M. et al. Práticas terapêuticas tradicionais: uso e conhecimento de plantas do cerrado no estado de Pernambuco (Nordeste do Brasil). p. 491–508, 2015.

DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **Journal of immunological methods**, v. 89, n. 2, p. 271–277, 22 maio 1986.

FELDMAN, K. S. et al. In vitro and In vivo inhibition of LPS-stimulated tumor necrosis factor- α secretion by the gallotannin β -D-pentagalloylglucose. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 11, n. 14, p. 1813–1815, 23 jul. 2001.

FERREIRA, M. R. A. **TRIAGEM ANTIFÚNGICA DE EXTRATOS OBTIDOS DE ESPÉCIES VEGETAIS DO NORDESTE BRASILEIRO**. [s.l: s.n.].

FRANÇA, T. C. C.; DOS SANTOS, M. G.; FIGUEROA-VILLAR, J. D. **Malária: Aspectos históricos e quimioterapia**. **Química Nova** Sociedade Brasileira de Química, , 2008.

FREITAS, A. C. C. DE. **Atividades biológicas de preparações obtidas de *Libidibia* (*Caesalpinia*) *ferrea* var. *parvifolia* (Mart. ex Tul.) LP Queiroz**. [s.l: s.n.].

GILL, R. Estudo farmacológico dos efeitos gastrointestinais e comportamentais do lupeol e da dilactona do ácido valonérico, isolados de *Cenostigma macrophyllum* Tul., em roedores. 2010.

GOMES, A. P. et al. Severe *Plasmodium falciparum* malaria. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 23, n. 3, p. 358–369, set. 2011.

GONZALEZ, F. G. **Estudo farmacognóstico e farmacológico de *Caesalpinia ferrea* Martius**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 6 maio 2005.

HENRIQUE, C. H. Avaliação da atividade antimicrobiana e moduladora do extrato etanólico de *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz. 2016.

KATSUNO, K. et al. Hit and lead criteria in drug discovery for infectious diseases of the

developing world. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 14, n. 11, p. 751–758, 1 nov. 2015.

KOBAYASHI, Y. T. DA S. et al. Avaliação fitoquímica e potencial cicatrizante do extrato etanólico dos frutos de Jucá (*Libidibia ferrea*) em ratos Wistar. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 52, n. 1, p. 34–40, 2015.

LAMBROS, C.; VANDERBERG, J. P. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. **Journal of Parasitology**, v. 65, n. 3, p. 418–420, 1979.

LIMA, K. G. Avaliação Do Efeito Do Ácido Gálico No Tratamento De Células De Hepatocarcinoma Hepg2. **Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul**, v. 1, p. 57, 2014.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras : manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. [s.l.] Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2002.

MAGALHÃES, L. S. et al. **Avaliação da atividade antibacteriana do extrato de *Caesalpinia ferrea* Martius e desenvolvimento de uma formulação fitocosmética**. [s.l.: s.n.].

MATSUZAKI, W. S. et al. Uso de teste de químio-sensibilidade para escolha da quimioterapia adjuvante no câncer gástrico avançado. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 33, n. 4, p. 228–234, ago. 2006.

MENEGUETTI, D. U. DE OLIVEIRA et al. Antimalarial ethnopharmacology in the Brazilian Amazon. **Revista de Ciências Farmaceuticas Basica e Aplicada**, v. 35, n. 3, p. 385–392, 2014.

MORENO-PÉREZ, D. A.; RUÍZ, J. A.; PATARROYO, M. A. Reticulocytes: *Plasmodium vivax* target cells. **Biology of the cell**, v. 105, n. 6, p. 251–260, jun. 2013.

MORENO, A. D. H. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana e citotoxicidade hemolítica em diferentes extratos vegetais. **Arquivos de Ciências da Saúde**, v. 25, n. 1, p. 11, 2018.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. **Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002**. **Journal of Natural Products**, 1 jul. 2003.

OLIVEIRA, A. F. et al. Avaliação da atividade cicatrizante do jucá (*Caesalpinia ferrea* Mart. ex Tul. var. *ferrea*) em lesões cutâneas de caprinos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 3, p. 302–310, 2010.

OLIVEIRA, I. V. P. DE M. et al. Evaluation macroscopically scar of the string bean and the hull of the caesalpinia ferrea (tul.) Martius (“jucá”) on the cutaneous wounds of the asinines (equus asinus). **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 8, n. 2, 7 jul. 2014.

PAIVA, W. D. S. et al. Atividade antibacteriana da casca do jucá (libidibia ferrea (mart. ex tul.) l. p. queiroz), frente a staphylococcus spp. isolados do leite de cabras com mastite. **Archives of Veterinary Science**, v. 20, n. 2, p. 141–146, 2015.

PARK, J. G. et al. Chemosensitivity testing of human colorectal carcinoma cell lines using a tetrazolium-based colorimetric assay. **Cancer research**, v. 47, n. 22, p. 5875–5879, 1987.

PASQUINI-NETTO, H. et al. Avaliação das atividades antioxidante, anti e pró-hemolítica do extrato etanólico das folhas de Pterogyne nitens Tul. (Fabaceae-Caesalpinioideae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 4, p. 666–672, 2012.

PATRA, N. et al. A novel epoxypropoxy flavonoid derivative and topoisomerase II inhibitor, MHY336, induces apoptosis in prostate cancer cells. **European journal of pharmacology**, v. 658, n. 2–3, p. 98–107, 11 maio 2011.

PEREIRA, J. R. C. S. et al. Cytotoxicity evaluation of marine alkaloid analogues of viscosaline and theonelladin C. **Biomedicine and Preventive Nutrition**, v. 2, n. 2, p. 145–148, abr. 2012.

REINERS, A. A. O. et al. User adherence and reactions to malaria treatment: implications for health education. **Texto e Contexto Enfermagem**, v. 19, n. 3, p. 536–544, jul. 2010.

SALAS, M. G. et al. Actividad Anticancerígena del Ácido Gálico en Modelos Biológicos in vitro. **Acta Química Mexicana**, v. 5, n. 9, p. 5–11, 2013.

SANTANA, L. S. ÁCIDO ELÁGICO E SEU PAPEL NA PREVENÇÃO E NO TRATAMENTO DO CÂNCER: REVISÃO INTEGRATIVA. p. 9–25, 2019.

SCHOONEN, W. G. E. J. et al. Cytotoxic effects of 110 reference compounds on HepG2 cells and for 60 compounds on HeLa, ECC-1 and CHO cells.: II Mechanistic assays on NAD(P)H, ATP and DNA contents. **Toxicology in Vitro**, v. 19, n. 4, p. 491–503, 1 jun. 2005.

SCHULZ, V. et al. Medicinal Plants, Phytomedicines, and Phytotherapy. In: **Rational Phytotherapy**. [s.l.] Springer Berlin Heidelberg, 2013. p. 1–42.

SILVA, N. C. DA et al. In vitro and in vivo antimalarial activity of the volatile oil of *Cyperus articulatus* (Cyperaceae). **Acta Amazonica**, v. 49, n. 4, p. 334–342, 1 out. 2019.

SKINNER-ADAMS, T. S. et al. Defining the targets of antiparasitic compounds. **Drug discovery today**, v. 21, n. 5, p. 725–739, 1 maio 2016.

SMILKSTEIN, M. et al. Simple and inexpensive fluorescence-based technique for high-throughput antimalarial drug screening. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 48, n. 5, p. 1803–1806, maio 2004.

SOUSA, M. J. B. DE. Avaliação do Potencial Genotóxico e Mutagênico de Extratos Padronizados de *Caesalpinia ferrea* (jucá) e *Brosimum gaudichaudii* (inharé). 28 mar. 2017.

TRAGER, W.; JENSEN, J. B. Human malaria parasites in continuous culture. **Science (New York, N.Y.)**, v. 193, n. 4254, p. 673–675, 1976.

WHO | World malaria report 2018. **WHO**, 2018.

WONG, R. P. M. et al. In vitro sensitivity of *Plasmodium falciparum* to conventional and novel antimalarial drugs in Papua New Guinea. **Tropical Medicine & International Health**, v. 15, n. 3, p. 342–349, 1 mar. 2010.