



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS**

LEONIA DA CONCEIÇÃO DE OLIVEIRA

**ESTUDO ETNOMEDICINAL E AVALIAÇÃO
EXPERIMENTAL DO EFEITO ANTIMALÁRICO DE
Ampelozizyphus amazonicus DUCKE EM MODELO
MURINO DE MALÁRIA CEREBRAL.**

**BELÉM-PA
2017**

LEONIA DA CONCEIÇÃO DE OLIVEIRA

**ESTUDO ETNOMEDICINAL E AVALIAÇÃO
EXPERIMENTAL DO EFEITO ANTIMALÁRICO DE
Ampelozizyphus amazonicus DUCKE EM MODELO
MURINO DE MALÁRIA CEREBRAL.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências como requisito para obtenção do título de Mestre em Biociências da Universidade Federal do Oeste do Pará. Orientador: Prof. Dr. Domingos Luiz Wanderley P. Diniz; Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Karen Renata Herculano Oliveira

**BELÉM-PA
2017**

LEONIA DA CONCEIÇÃO DE OLIVEIRA

**ESTUDO ETNOMEDICINAL E AVALIAÇÃO
EXPERIMENTAL DO EFEITO ANTIMALÁRICO DE
Ampelozizyphus amazonicus DUCKE EM MODELO
MURINO DE MALÁRIA CEREBRAL.**

Conceito:

Data de Aprovação ____/____/____

Banca Examinadora:

Orientador: Prof. Dr. Domingos Luiz Wanderley P. Diniz – Orientador UFOPA

Co-orientadora: Prof. Dra. Karen Renata Herculano Matos Oliveira-UFPA

Avaliador 1: Prof. Dr. Evander de Jesus de Oliveira Batista

Avaliador 2: Prof. Dr. Anderson Manoel Herculano de Oliveira Silva

Suplente: Prof. Dra. Adelaide da Conceição Fonseca Passos

A toda minha família pelo apoio, amor, força, carinho e confiança em mim sempre depositado, e que mesmo às dificuldades enfrentadas, contribuíram para minha formação e engrandecimento pessoal e profissional.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus por me dar saúde e fazer acreditar que cada coisa acontece no seu tempo e que fé, esperança, paciência e dedicação são componentes primordiais para o sucesso.

Aos meus pais, Mariana e Luís pelo carinho, dedicação, incentivo, pelos valiosos conselhos, por todo o investimento e educação, por não medirem esforços para que pudesse alcançar meus sonhos e objetivos e pelo amor incondicional.

Aos meus irmãos, fundamentais na minha vida e em especial minhas irmãs Cleubia e Leonora, por acreditarem e torcerem sempre por mim sempre.

Aos meus avós, (*in memoriam*) Maria, Raimundo (Seu Mundico), “Ovô” Antônio, Nazaré (Mamãe Guita), minha “Ovó” Raimunda que foram meus exemplos, pelo carinho, apoio, incentivo e por se alegrarem tanto com as conquistas de seus netos mesmo nem sabendo os reais significados.

A todos os meus familiares, por sempre me apoiaram e me incentivaram em especial minhas tias: Sonia Oliveira, Antônia da Conceição, Nely da Conceição, meu primo Jairo Oliveira.

À Frederico Farias pelo incentivo, força e todo apoio que me foi dado.

Aos amigos Nailce Picanço, Arciro Waytia, Nonato Cância, Marcos Oliveira, Eldra Carvalho e aos irmãos Marinho (Arlete, Ederson e Albanira), muito obrigada pelo amparo, acolhimento, amizade, por poder contar, quando mais precisei e por terem sido minha família em Belém. “Orixiamigos”, muito obrigada mesmo.

A todos os meus amigos, que longe ou perto, sempre me incentivaram e acreditaram em mim. Um agradecimento especial à minha amiga e confidente, Josiane de Almeida Paulino por todas as conversas, apoio, incentivo, ajuda a superar momentos muito difíceis e por estar sempre ao meu lado desde o começo e quando eu mais precisei.

Ao professor Domingos Diniz, meu orientador, pela amizade, confiança, apoio, incentivo, pelas inúmeras oportunidades, pelo exemplo de profissionalismo e dedicação e por me inspirar a seguir a carreira acadêmica.

À professora Karen Renata Oliveira, minha co-orientadora, pelo acolhimento, apoio, incentivo e acima de tudo por confiar em mim e me abrir inúmeras portas de seu laboratório que me possibilitaram chegar até aqui e pela essencial ajuda, e conhecimento fundamentais para a realização e desenvolvimento dessa dissertação.

Ao professor Anderson Manoel Herculano chefe do Laboratório de Neurofarmacologia Experimental, por permitir a utilização de seu laboratório para a realização dos experimentos pela possibilidade de desenvolvimento deste trabalho

Ao professor Lourivaldo dos Santos do laboratório de Síntese e Cromatografia por ter cedido seu laboratório para preparação dos Extratos e pelas contribuições no trabalho.

À Aluna de Mestrado Fabiane Trindade do laboratório de Síntese e Cromatografia, por todas as contribuições e pela grande ajuda com a preparação dos extratos.

Ao professor Evander Batista, pelo carinho, amizade e incentivo.

Aos amigos do Laboratório de Neurofarmacologia Experimental, pela receptividade, convivência, momentos de descontração, incentivo, pelas colaborações e por toda ajuda e discussões tão valiosas, em especial: À Larissa Medeiros, Nívia Mendes, Nicole Mulatinho e Giovanni Rodrigues pela amizade, pelas valiosas conversas científicas e pela imensa ajuda nos experimentos e troca de conhecimentos e grande colaboração, essenciais para a realização deste trabalho.

À Nayara Kauffman por me ensinar aspectos importantes relacionados nas técnicas de Modelos de Malária experimental essenciais para o estudo da doença e para o desenvolvimento do trabalho.

À Daniele Valente Braga, Marjorie Torres, Talita Moura e Ketan Brodeur pela amizade, e contribuição no trabalho.

Ao Bioterista Amarildo Melo, pela grande ajuda com os animais experimentais de grande importância para a realização deste trabalho, e pelo apoio e amizade.

Ao Senhor Manoel Cordeiro, por todo apoio, incentivo, amizade, e contribuição no trabalho.

Ao Grupo de Pesquisa em Fisiologia Ambiental.

Aos alunos do Programa PAI.

À Universidade Federal do Oeste do Pará pela implantação de um Programa de Pós-Graduação em Oriximiná.

À CAPES pelo apoio e incentivo financeiro.

“As ciências”

“As ciências têm as raízes amargas, porém os frutos são doces.” — Aristóteles

RESUMO

A malária é uma doença causada por protozoários do gênero *Plasmodium* e apresenta-se como um grave problema de saúde pública em países subdesenvolvidos. A malária cerebral (MC) é a patologia mais grave que pode resultar da infecção por *P. falciparum* nos humanos e caracteriza-se por uma variedade de manifestações clínicas, que incluem alterações do nível de consciência, diferentes sinais neurológicos focais, além de alterações cognitivas e comportamentais. No município de Oriximiná é comum o uso de plantas medicinais para o uso de várias doenças, incluindo a malária. Realizou-se um estudo prévio em duas comunidades quilombolas do Município de Oriximiná/PA: Araçá de Fora (Rio Erepecurú) e Tapagem (Rio Trombetas), afim de, identificar os vegetais utilizados, a indicação do tratamento e as formas de preparo, através de visitas as comunidades. A partir desse estudo, observamos que a indicação do tratamento com *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke – Saracuramirá- (*A.a*) foi citada como planta medicinal utilizada para o uso do tratamento da malária está presente em ambas as comunidades. A partir daí decidimos fazer um estudo experimental da planta. O objetivo deste trabalho é avaliar o efeito da *A.a* na evolução do quadro de Malária Cerebral murina e frente aos danos causados pela infecção com cepa ANKA de *Plasmodium berghei* (*PbA*). Para isso foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6, o qual foi inoculado ($\sim 10^6$ de eritrócitos parasitados) via intraperitoneal. Os grupos foram divididos em: grupo malária (*PbA*) (n=14), grupo *PbA* + *A.a* 10 mg (n=14), grupo *PbA* + *A.a* 20mg (n=14), tratados por 8 dias consecutivos. O desenvolvimento da doença foi monitorado diariamente pela determinação da sobrevivência, massa corpórea e a parasitemia foi monitorada a cada três dias em distensões sanguíneas, e avaliamos ainda o peso do fígado de camundongos C57BL/6 no 10º dia pós infecção. Nossos dados demonstraram que o tratamento com *A.a* nas doses de 10mg/Kg e 20mg/kg diminuiu significativamente a mortalidade dos animais infectados uma vez que no 13º dia pós infecção 21,42% e 53,88% dos animais dos grupos *A.a* nas doses de 10mg/Kg e 20mg/kg respectivamente, estavam vivos, enquanto que o grupo infectado com *PbA* no 11º representava apenas 7,42% dos animais vivos. Em relação a massa corpórea não observamos perdas significativa entre os grupos, todos os grupos infectados perderam massa corpórea entre o 3º e 13º de acordo com a progressão da infecção. Houve também uma diminuição

significativa da parasitemia dos animais infectados e tratados com *A.a* nas doses de 10mg/Kg e 20mg/kg (32,12% e 27,70% respectivamente) inferior ao grupo *PbA* com 57,96 %. A hepatotectomia do fígado, deixou evidente a hepatomegalia nos grupos infectados e confirmou que as alterações encontradas foram mais expressas no grupo *PbA*, concluindo que a *A.a* quando administrada via intraperitoneal nas doses de 10 mg/Kg e 20 mg/Kg, possui efeito protetor na sobrevivência e parasitemia de camundongos infectados com a cepa ANKA em modelo de Malária Experimental.

Palavras-chave: *Ampelozizyphus amazonicus*. Malária Cerebral. Oriximiná.

ABSTRACT

Malaria is a disease caused by the protozoan genus *Plasmodium* and presents itself as a grave public health issue in underdeveloped countries. Cerebral Malaria (CM) is the most severe pathology that can result from infection by *P. falciparum* in humans and is characterized by a variety of clinical manifestations, that include alterations in the level of consciousness, different neurological focal signals, and other cognitive and behavioral alterations. In the municipal of Oriximiná it is common to use medicinal plants for the purpose of various diseases, including malaria. A previous study in two quilombola communities from the Municipal of Oriximiná/PA: Araçá de Fora (Erepecurú River) and Tapagem (Trombetas River), was used in order to identify the utilized vegetation, the indication for treatment, and the forms of preparation, through visits to the communities. From this study, we observed that the indication for treatment with *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke – Saracuramirá- (*A.a*), was cited as the medicinal plant utilized for the use of malaria treatment in both of the communities. From there we decided to do an experimental study on the plant. The objective of this work is to evaluate the effects of *A.a* in the evolutionary frame of murine cerebral malaria and the effects of the damage caused by the infection with the strain ANKA from *Plasmodium berghei* (*PbA*). The mouse line C57BL/6 were utilized and were inoculated intraperitoneally ($\sim 10^6$ of parasitized erythrocytes). The groups were divided in the following manner: malaria (*PbA*) group (n=14), *PbA* group + *A.a* 10mg (n=14), *PbA* group + *A.a* 20mg (n=14), treated for 8 consecutive days. The development of the disease was monitored daily for the survival rate, corporeal mass, the parasites were monitored every three days by blood staining, and the weight of the mouse C57BL/6 liver was evaluated on the 10th day post infection. Our data demonstrated that the *A.a* treatment in the 10mg/Kg and 20mg/Kg dosage decreased the mortality of the infected animals on the 13th day post infection. 21.42% and 53.88% of the animal groups *A.a* in the dosage of 10mg/Kg and 20mg/Kg respectively, were alive, while in the infected group with *PbA*, on the 11th day, only 7.42% of the animals were alive. In relation to the corporeal mass, we did not observe significant loss between the groups, all of the infected groups lost corporeal mass between the third and 13th day according to the progress of the infection. The infected and treated animals with *A.a* with the dosages of 10mg/Kg and 20mg/Kg presented a parasited

percentage (32.12% and 27.70% respectively) less than the *PbA* group with 57.96% parasited. The hepatectomy of the liver, made evident the hepatomegaly in the infected groups and confirmed that the encountered alterations were most expressed in the *PbA* group, concluding that Saracuramirá, when administered intraperitoneally of 10mg/Kg and 20mg/Kg, can have protecting effects on the survival rate and parasitemia of infected mice with the ANKA strain in the CM model.

Key-words: *Ampelozizyphus amazonicus*. Cerebral Malária. Oriximiná.

LISTA ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Casos notificados de malária no ano de 2015.....	2
Figura 2: Prevalência e distribuição geográfica de casos clínicos da malária no Brasil.....	3
Figura 3: Ciclo de vida do parasita da malária	5
Quadro 1: Infecção por <i>Plasmodium</i> em diferentes linhagens de camundongos.....	11
Figura 4: Propriedades de uso medicinal para a <i>A.a</i> citadas pelos quilombolas de Oriximiná, segundo a Classificação Internacional de Doenças e Problemas relacionados à saúde CID -10.....	16
Figura 5: Localização geográfica das comunidades quilombolas Tapagem localizada no Rio Trombetas e Araçá de fora localizada no Rio Erepecurú.....	21
Figura 6: Processamento do material vegetal (<i>A. amazonicus</i>).....	22
Fluxograma 1: Extração (percolação) dos extratos de <i>A. amazonicus</i> em solventes de polaridades crescentes.....	23
Figura 7: Processo de preparação dos extratos (Extração, filtração e concentração).....	24
Figura 8: Extensão sanguínea de camundongo m camundongos C57BL/6 inoculados com a cepa ANKA de <i>Plasmodium berghei</i> (PbA).....	28
Gráfico 1: Curva de sobrevivência.....	34

Gráfico 2: Massa Corpórea pós-infecção.....	35
Figura 9: Fotomicrografias de distensões sanguíneas de camundongos C57BL/6.....	36
Gráfico 3: Percentual de parasitemia.....	37
Figura 10: Análise qualitativa da parasitemia dos camundongos C57BL/6 dos grupos infectados.....	38
Figura 11: Análise qualitativa do Fígado dos camundongos C57BL/6 dos grupos controle e infectados.....	49
Gráfico 4: Peso do fígado: dos camundongos C57BL/6 dos grupos controle e infectados.....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Delineamento dos grupos experimentais de acordo com os tratamentos	26
Tabela 2: Lista das etnoespécies de uso medicinal na comunidade de Tapagem no Alto Trombetas/ Oriximiná/ Pará.....	31
Tabela 3: Lista das etnoespécies citadas como recurso medicinal, parte utilizada, indicação na comunidade do Araçá de Fora no Rio Erepecurú/ Oriximiná/ Pará.....	32

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

- Aa* - *Ampelozizyphus amazonicus*;
A.a - *Ampelozizyphus amazonicus*;
A. - *Ampelozizyphus*;
AE – Acetato de Etilo;
ANOVA – Análise de Variância;
ATPase – Adenosinatrifosfatase;
BHE – Barreira hematoencefálica;
CEUA – Comitê de tica de Uso Animal;
DMSO – Dimetilsulfóxido;
DNA - cido Desoxirribonucleico;
d.p.i – dia pós-infecção;
EA – Extrato de Acetato;
EH – Extrato de Hexano;
EM – Extrato de methanol;
i.p – Intraperitoneal;
MC – Malária Cerebral
MCE – Malária Cerebral experimental;
MS – Ministério da Saúde;
OMS – Organização Mundial da Saúde;
PbA – *Plasmdium berghei* ANKA
P. – *Plasmodium*;
PBS - phosphate buffered saline;
p.t – Pré-tratamento;
SIDA – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida;
SNC – Sistema Nervoso Central;
TCL – Termo de Consentimento livre e esclarecido;

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 MALÁRIA.....	1
1.2 CICLO BIOLÓGICO DO PARASITA E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	3
1.3 MALÁRIA CEREBRAL.....	7
1.4 FISIOPATOLOGIA E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA MALÁRIA CEREBRAL.....	8
1.5 MODELOS EXPERIMENTAIS DE MALÁRIA CEREBRAL.....	9
1.6 ETNOBOTÂNICA, PLANTAS MEDICINAIS E A MALÁRIA.....	13
1.7 <i>Ampelozizyphus amazonicus</i> Ducke (Aa) – Saracuramirá-.....	14
2. JUSTIFICATIVA	18
3. OBJETIVOS	19
3.1. GERAL	19
3.2. ESPECÍFICOS.....	19
4. MATERIAIS E MÉTODOS	20
4.1 PESQUISA ETNOMEDICINAL EM COMUNIDADES QUILOMBOLAS.....	20
4.2. MATERIAL VEGETAL	21
4.2.1 Coleta, identificação e exsicata	21
4.2.2. Obtenção dos extratos	22
4.3 ANIMAIS	24
4.4 NORMAS ÉTICAS	25
4.5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	25
4.6 TRATAMENTO COM <i>Ampelozizyphus amazonicus</i> (SARACURA MIRÁ)	26
4.7 INDUÇÃO DO QUADRO DE MALÁRIA EXPERIMENTAL COM <i>P. berghei</i> ANKA.....	26

4.7.1 Análise da sobrevivência	27
4.7.2 Acompanhamento de massa corpórea	27
4.7.3 Avaliação da parasitemia	28
3.8 PESAGEM DO FÍGADO	29
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	29
6. RESULTADOS	30
6.1 PESQUISA ETNOMEDICINAL EM COMUNIDADES QUILOMBOLAS.....	30
6.2. CARACTERIZAÇÃO DO QUADRO DE MALÁRIA E AVALIAÇÃO DOS POSSÍVEIS EFEITOS DE <i>Aa</i>	33
6.2.1 Sobrevivência dos animais após infecção por <i>PbA</i>	33
6.2.2 Evolução da massa corpórea dos animais.....	35
6.2.3 Avaliação da parasitemia	36
6.3 PESO DO FÍGADO	38
7. DISCUSSÃO.....	41
8. CONCLUSÃO	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49
APÊNDICE.....	57
ANEXO	58

1. INTRODUÇÃO

1.1 MALÁRIA

No contexto das endemias mundiais, a malária é considerada como uma das doenças infecto-parasitas com maiores taxas de mortalidade, assemelhando-se a outras doenças infecciosas como tuberculose e SIDA (Síndrome de Imunodeficiência Adquirida). Tal padrão, a caracteriza como um grave problema de saúde pública, principalmente em países em desenvolvimento (HUNT et al., 2006; DOOLAN et al., 2009; MARTINS et al., 2009).

A malária também é chamada de paludismo, impaludismo, febre palustre, febre intermitente, febre terçã benigna, febre terçã maligna, além de nomes populares como maleita, sezão, tremedeira, batedeira ou febre. É definida como uma doença infecciosa, febril, não contagiosa, de evolução crônica, com manifestações episódicas de caráter agudo (BRASIL, 2013). Atualmente atinge cerca de 97 países, sendo endêmica nas regiões tropicais e subtropicais da África, Sudeste Asiático e América Latina. Estima-se que cerca de 3,2 bilhões de pessoas correm risco de contrair a doença (WHO, 2015).

Essa doença infecciosa, é causada por protozoários do gênero *Plasmodium* e transmitida ao homem por fêmeas de mosquitos do gênero *Anopheles*, produzindo febre, além de outros sintomas. O gênero do mosquito (*Anopheles*), conhecidos como carapanã na Amazônia, corresponde a aproximadamente 400 espécies sendo que apenas 60 ocorrem no Brasil. Dentre as 60, a principal espécie vetor da malária do Brasil é *Anopheles darlingi* (BRASIL, 2015).

Cinco espécies de protozoários do gênero *Plasmodium* (*P*) podem causar a malária humana: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. knowlesi*. No Brasil, três espécies estão associadas à malária em seres humanos: *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae*, sendo as infecções por *P. vivax* predominantes, seguido das infecções por *P. falciparum*, a forma mais grave. Em relação ao *P. ovale*, nunca foi registrada transmissão autóctone no Brasil estando restrita a determinadas regiões do continente africano e a casos importados de malária no Brasil (BRASIL, 2015). O *P. knowlesi* é causador de malária em macacos no sudeste asiático, foi reconhecido como causador de um tipo específico de malária em humanos (WHITE, 2008; DANESHVAR et al. 2009). Em 2011,

11,93% dos casos de malária correspondiam a infecção por *P. falciparum* e 86,81% de casos por *P. vivax* (BRASIL, 2013).

No Brasil, cerca de 99% dos casos são observados na região Amazônica (Figura 2), incluindo os Estados do Amazonas, Pará, Acre, Roraima, Rondônia, Amapá, Mato Grosso, Tocantins e Maranhão, que apresentam uma incidência anual de 400-700 mil casos (BRASIL, 2015). Além disso, o grande fluxo migratório da região Amazônica para outros estados brasileiros tem levado ao surgimento de surtos de malária em áreas consideradas livres de transmissão da doença (OMS, 2015).

Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) mostram que seu impacto sobre as populações humanas continua aumentando: ocorre em mais de 90 países, pondo em risco cerca de 40% da população mundial. Representa, ainda, risco elevado para viajantes e migrantes, com casos importados em áreas não endêmicas. (BRASIL, 2013).

Já no Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde (MS), em 2015 foi registrado o menor número de casos de malária dos últimos 35 anos, com a notificação de 143.647 casos em todo o território nacional, sendo que desses 138.697 foram de casos autóctones e 4.953 importados de outros países (figura 1). Mesmo com poucos casos de malária autóctone na região extra-amazônica, a vigilância é mantida, procurando evitar a reintrodução da doença devido ao fluxo migratório por áreas suscetíveis, assim como o aumento da letalidade por diagnóstico tardio (PORTAL SAÚDE, 2016).

Mês	Exame	Exame	Positivo	Positivo	Exame	Positivo	Importado	LVC	LVC	PLP	% F	F	V	F+V	M	O	Não F	
	Deteção	Deteção	Deteção	Deteção														Total
	Passiva	Ativa	Passiva	Ativa														
JANEIRO	61.906	64.537	7.261	2.334	126.443	9.615	9.263	352	5.456	1.574	7,60%	1,12%	1.416	8.070	84	3	0	42
FEVEREIRO	58.135	62.413	6.524	2.254	120.548	8.778	8.440	338	4.564	1.166	7,28%	1,00%	1.200	7.507	49	5	0	17
MARÇO	63.060	74.865	6.637	2.628	137.925	9.265	8.901	364	5.291	1.368	6,72%	0,84%	1.155	7.988	55	6	1	60
ABRIL	63.299	71.126	6.968	3.126	134.425	10.116	9.728	388	4.911	1.210	7,53%	0,98%	1.323	8.688	69	2	1	33
MAIO	67.072	80.438	7.701	3.912	147.511	11.613	11.114	499	6.061	1.477	7,67%	0,83%	1.231	10.231	60	1	0	90
JUNHO	66.018	74.367	9.118	3.852	140.385	12.970	12.501	469	6.673	1.660	9,24%	0,96%	1.343	11.483	65	4	0	75
JULHO	63.958	79.165	10.865	4.514	143.143	15.379	14.769	610	8.544	2.172	10,74%	1,00%	1.432	13.695	69	4	0	179
AGOSTO	61.002	69.049	11.406	4.554	130.051	15.960	15.480	482	9.887	2.524	12,27%	1,15%	1.495	14.234	77	5	0	151
SETEMBRO	59.177	62.027	11.360	3.796	121.204	15.178	14.810	368	10.035	2.609	12,52%	1,07%	1.293	13.587	74	6	0	218
OUTUBRO	51.496	55.363	9.279	3.133	106.879	12.412	12.080	333	9.798	2.580	11,61%	1,25%	1.331	10.758	81	2	0	241
NOVEMBRO	49.013	58.337	8.741	2.661	107.350	11.402	11.045	356	8.707	2.467	10,62%	1,35%	1.448	9.733	66	2	0	153
DEZEMBRO	47.458	45.793	8.546	2.413	93.251	10.959	10.565	394	7.337	2.107	11,75%	1,48%	1.361	9.397	67	3	1	110
Total	711.594	797.521	104.466	39.181	1.509.115	143.647	138.697	4.953	87.264	23.324	9,52%	1,06%	16.048	125.371	816	43	3	1.369

Figura 1: Casos notificados de Malária no ano de 2015 (DATASUS,2016)

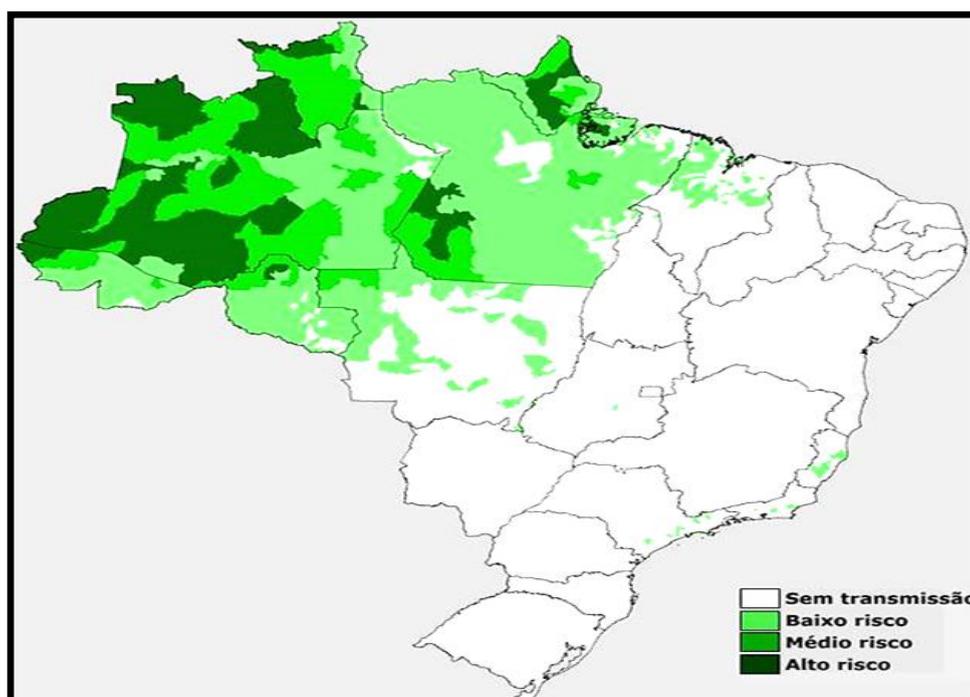


Figura 2: Prevalência e distribuição geográfica de casos clínicos da malária no Brasil.
Fonte: Sinan/SVS/MS e Sivep-Malária/SVS/MS, 2015.

1.2 CICLO BIOLÓGICO DO PARASITA E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

O ciclo biológico da malária foi descrito apenas em 1900 por Ronald Ross, médico militar britânico. Envolve dois hospedeiros para se completar: o hospedeiro vertebrado, no qual acontece a reprodução assexuada (esquizogônica), e o vetor mosquito fêmea, do gênero *Anopheles sp.*, no qual ocorre a reprodução sexuada (esporogônica) (MURGATROYD, 1952).

O ciclo se inicia com a picada do mosquito fêmea e a entrada de esporozoítos na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado (VANDERBERG & FREVERT, 2004). Em seguida, os esporozoítos chegam ao fígado, atingindo especificamente as células hepáticas (hepatócitos), dando início a fase assexuada ou fase pré-eritrocítica da doença (Figura 2) (TAVARES et al., 2013). No interior dessas células, os esporozoítos sofrem esquizogonia tecidual e se diferenciam em merozoítos hepáticos. A formação de vesículas, denominadas merossomos, que se destacam nos hepatócitos, garante uma liberação segura dos merozoítos para a circulação, evitando a fagocitose por macrófagos

residentes (células de Kupffer) presentes em grande número nos capilares sinusóides hepáticos (DE SOUZA E RILEY, 2002).

Nos hepatócitos, os esporozoítos permanecerão por cerca de 2-16 dias, e irão se proliferar dando origem aos merozoítos. Durante esta fase, a infecção é assintomática, sendo que cada esporozoíto é capaz de produzir cerca de 30.000 merozoítos. Em seguida, os hepatócitos se rompem liberando os merozoítos na corrente sanguínea, que invadirão os eritrócitos iniciando então a fase eritrocítica do ciclo. Os merozoítos que chegam à circulação são capazes de invadir eritrócitos, iniciando a fase eritrocítica da infecção, na qual ocorrem as manifestações clínicas que caracterizam a doença (MILLER et al., 2002). Ao invadir o eritrócito, iniciará uma fase cíclica na qual progride para um trofozoíto e para esquizonte maduro, o qual rompe o eritrócito liberando novos merozoítos, que invadirão outros eritrócitos (DE SOUZA E RILEY, 2002).

Dentro dos eritrócitos, os merozoítos passam por três estágios que são: anel, trofozoíto e esquizonte, sendo que cada esquizonte é capaz de conter cerca de 20 merozoítos que serão liberados na corrente sanguínea após a ruptura dos eritrócitos infectados. Alguns merozoítos, por um mecanismo desconhecido, se diferenciam em gametócitos (machos e fêmeas) que ao serem ingeridos pelo mosquito *Anopheles* sofrem maturação em seu estômago e se fundem, formando o zigoto. Este zigoto se transforma em oocineto, que migra para a parede do intestino do inseto formando o oocisto. O oocisto evolui a esporozoítos, que são liberados na hemolinfa e migram para as glândulas salivares dos insetos. A inoculação dos esporozoítos em um novo hospedeiro humano proporciona a continuidade do ciclo de vida do *Plasmodium* (BRASIL, 2005; GARCIA, 2010; SADANAND, 2010).

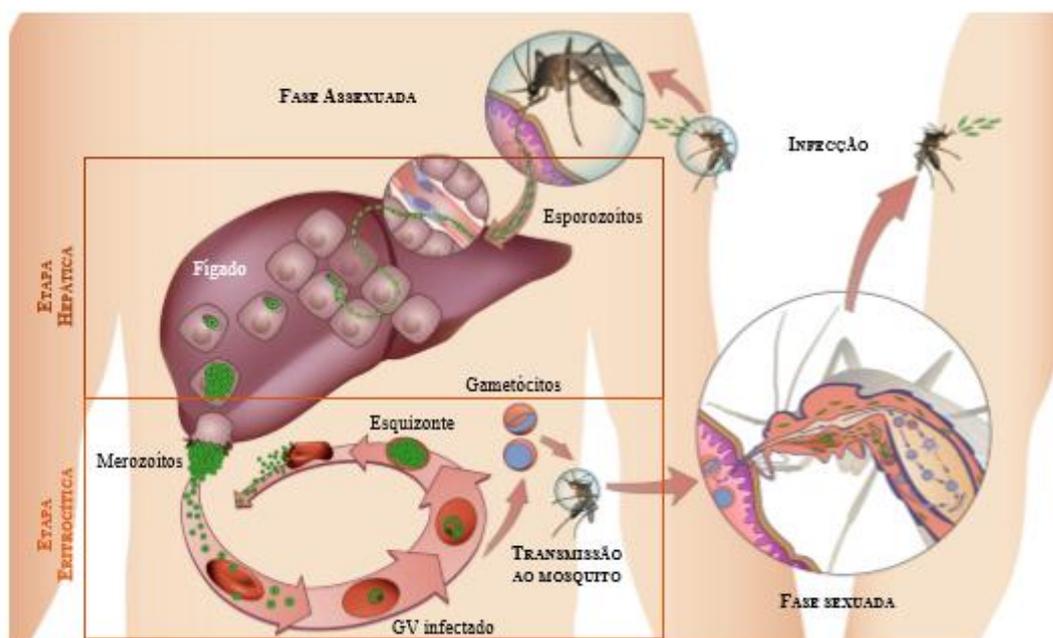


Figura 3: Ciclo de vida do parasita da malária (Adaptado de IMM, 2006)

A fase hepática do ciclo, gera diversos danos durante o decurso da doença e frequentemente se estende para outros órgãos, além disso, tais alterações são caracterizadas por serem de patologia heterogênea, com gravidade variável, podendo apresentar quadros de insuficiência hepática, hepatomegalia, icterícia e aumento das enzimas hepáticas (CORONADO, NADOVICH, SPADAFORA, 2014).

Estudos já demonstraram que os danos ocasionados no fígado, como a hepatomegalia, aumento das transaminases e fibrose, podem levar ao aumento na formação de espécies reativas de oxigênio, levando ao quadro de estresse oxidativo no paciente (CERIOTTI et al., 2010).

Em relação às alterações anatômicas e fisiológicas nos diversos órgãos e tecidos, o fígado e principalmente o sangue sofrem modificações significativas. O fígado na fase aguda apresenta-se progressivamente aumentado e pigmentado. Com o avanço da doença, parasitos e hemácias fagocitadas são vistos no interior dos macrófagos e os hepatócitos apresentam alterações nucleares e infiltração gordurosa (REY, 1992; COTRAN, 2000)

No sangue, a destruição das hemácias corresponde à manifestação mais clara da doença. Existem várias suposições do mecanismo para a evolução da condição anêmica da malária, dentre estas, cabe ressaltar a capacidade dos macrófagos em fagocitar

eritrócitos contendo os parasitos ou não, resultando na destruição de hemácias normais nesse processo autoimune (REY, 1992).

Na fase inicial da doença a sintomatologia é inespecífica, como mal-estar acompanhado de cefaleia, cansaço e mialgia, sendo geralmente precedidos de febre. Em seguida, a febre assume um caráter intermitente, dependendo do tempo de duração do ciclo eritrocítico de cada espécie de *Plasmodium* (LONGLLEY et al., 2015). Contudo, esse quadro clássico pode ser alterado pelo uso de drogas profiláticas ou aquisição de imunidade, e muitos desses sintomas podem ou não estar presentes e até mesmo todos podem estar ausentes. Nos casos complicados, podem ainda ocorrer dor abdominal forte, sonolência e redução da consciência – podendo levar ao coma nos casos de malária cerebral (MS, 2005).

Embora os ciclos evolutivos das espécies causadoras sejam similares, do ponto de vista patológico a infecção malárica apresenta diferenciações que podem determinar as variações na evolução clínica da doença. A infecção de indivíduos não imunes pelo *P. falciparum* pode resultar em forma grave e complicada, caracterizada pelo acometimento e disfunção de vários órgãos ou sistemas: sistema nervoso central, sistema hematopoiético, aparelho respiratório, fígado, sistema circulatório, rins e coagulação sanguínea. Assim, todo paciente portador dessa espécie de plasmódio deve merecer atenção especial, de modo a receber tratamento imediato, essencial para prevenir tais complicações (BRASIL, 2005).

As infecções por *P. falciparum* podem levar a forma complicada, denominada malária grave, considerada uma doença multissistêmica, capaz de afetar diretamente o sistema nervoso central (SNC), causando déficits neurológicos e cognitivos que caracterizam a malária cerebral, além de anemia grave, insuficiência renal aguda, edema pulmonar, hipoglicemia, colapso circulatório e acidose metabólica (MILLER et al., 2002; MUNGALA-ODERA et al., 2004). É fundamental ressaltar que o curso clínico da doença depende de fatores associados tanto ao parasito quanto ao hospedeiro, além de questões geográficas e sociais (MILLER et al., 2002). Em 2015 foram registrados 15.442 casos autóctones de malária *falciparum*, uma redução de aproximadamente 29% em relação ao ano anterior, quando tinham sido registrados mais de 22 mil casos (BRASIL, 2015)

1.3 MALÁRIA CEREBRAL

A malária cerebral (MC) é a patologia mais grave que pode resultar da infecção por *P. falciparum* nos humanos. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a MC é uma encefalopatia com estado de coma associado a desordens neurológicas provenientes de eventos hemorrágicos (LOU et al., 2001). Os pacientes que sobrevivem à doença apresentam complicações neurológicas permanentes como desordens de cognição e fala, anormalidades motoras e cegueira cortical (BONDI, 1992; SCHOFIELD et al., 2005).

A MC constitui a principal e mais grave complicação resultante da infecção pelo *P. falciparum*, sendo responsável pela maioria dos casos de incapacidade e óbito (MUNG'ALA-ODERA et al., 2004; IDRO et al., 2005). Estima-se que em todo mundo ocorra anualmente 2,3 milhões de óbitos em decorrência dessa condição (SNOW et al., 2005) e que 10 a 17% dos que sobrevivem ao quadro de MC permanecem com algum déficit cognitivo e/ou comportamental (MURPHY E BREMAN, 2001).

Contudo, o desenvolvimento da patogênese da MC ainda é pouco compreendido e devido ao seu impacto em crianças e mulheres grávidas, tem sido realizados vários estudos para melhor esclarecer os mecanismos e melhorar a sua caracterização a nível patológico, sendo propostas duas teorias que buscam elucidar seus mecanismos (BERENDT et al., 1994; CARVALHO et al., 2014; COMBES et al., 2006; HUNT & GRAU 2003; MARTINS et al., 2009; MEDANA & TURNER, 2006; MILLER et al., 2002). A primeira delas, a teoria da obstrução mecânica, proposta por Marchiafava & Bignami (1894), postula que a malária cerebral é consequência de um quadro de hipóxia cerebral ocasionado pelo bloqueio do fluxo sanguíneo decorrente da aderência de eritrócitos parasitados no endotélio vascular cerebral (IDRO et al., 2005; MILLER et al., 2002). Por outro lado, a teoria da inflamação sugere que a MC é resultado de uma resposta imune exacerbada, na qual citocinas tipo Th1, especialmente TNF- α e IFN- γ , apresentam um papel central no processo (CLARK & ROCKETT, 1994). O mérito relativo destas duas teorias tem sido extensivamente debatido, com um consenso em considerar uma hipótese conciliatória (VAN DER HEYDE et al., 2006).

1.4 FISIOPATOLOGIA E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA MALÁRIA CEREBRAL

A MC manifesta-se principalmente por alterações do nível de consciência, episódios de crises epiléticas, diferentes sinais neurológicos focais, além de alterações cognitivas e comportamentais (NEWTON et al., 2000; IDRO et al., 2005, MISHRA & NEWTON, 2009).

O quadro de MC apresenta uma patogênese complexa, sendo definida como um estado de coma associado a complicações neurológicas provenientes de eventos hemorrágicos. As microhemorragias, por sua vez, são resultantes do sequestro de eritrócitos parasitados na microcirculação cerebral e do consequente dano endotelial (CHEN et al., 2000; DESRUISSEAUX et al., 2010).

A evolução do quadro de coma é geralmente acompanhada por febre, cefaleia, convulsões, acidose metabólica e hipoglicemia, com índice de mortalidade entre 30-50 %. Os pacientes que sobrevivem à síndrome apresentam complicações neurológicas permanentes como desordens de cognição e fala, anormalidades motoras e cegueira cortical (BONDI, 1992; MARSH et al., 1996; SCHOFIELD et al., 2005).

Estudos têm correlacionado diferentes manifestações clínicas com achados histopatológicos de material post-mortem humano. Esses estudos têm demonstrado acúmulo de eritrócitos parasitados na microvasculatura cerebral, adesão endotelial ou acúmulo de leucócitos mononucleares e plaquetas nos capilares cerebrais, sinais morfológicos de ativação de astrócitos e microglia, presença de hemorragia no parênquima cerebral, lesão axonal e desmielinização, além de edema cerebral, principalmente no estágio final da doença (NEWTON et al., 2000; HUNT & GRAU, 2003).

Embora contribuam para caracterização dos aspectos histopatológicos da MC, os estudos post-mortem apresentam limitações, pois não permitem a investigação dos mecanismos fisiopatológicos durante o curso da doença. Nesse contexto, os estudos em modelos experimentais de MC têm sido de grande relevância, uma vez que mimetizam grande parte das alterações clínicas descritas em humanos e permitem investigar fatores envolvidos na patogênese dessa condição (DE SOUZA & RILEY, 2002; LACERDA-QUEIROZ et al., 2010).

1.5 MODELOS EXPERIMENTAIS DE MALÁRIA CEREBRAL

Modelos experimentais utilizando roedores já estão bem caracterizados e estabelecidos na literatura, sendo de extrema importância para a pesquisa científica (BAZIR et al., 2012). Devido às dificuldades em acompanhar casos de MC humana e a limitada possibilidade de examinar os processos patológicos, alguns modelos experimentais de MC foram desenvolvidos (COMBES et al., 2005).

O modelo experimental com primatas apresenta características muito similares às descritas na MC humana, em especial o sequestro de eritrócitos infectados na microvasculatura cerebral e a ocorrência de complicações vasculares como hemorragias. Entretanto, esse modelo apresenta importantes limitações em relação à dificuldade em determinar o início dos sinais clínicos, a baixa incidência de casos, alto custo e a ausência de animais geneticamente modificados, o que dificulta o estudo e a compreensão dos eventos celulares e moleculares responsáveis pelas alterações cerebrais (LOU et al., 2001).

O modelo experimental utilizando roedores é bem caracterizado e útil para a pesquisa científica. A grande diversidade de linhagens de camundongos associada à infecção com diferentes espécies de *Plasmodium* (*P. chabaudi*, *P. yoelii*, *P. berghei* e *P. vinckei*) têm contribuído para elucidar mecanismos envolvidos na patogênese da doença (DE SOUZA & RILEY, 2002).

Dentre essas espécies apenas o *P. berghei* e o *P. yoelii* são capazes de induzir o quadro de MC experimental. A maioria dos estudos relacionados à MC provém do modelo de infecção por *P. berghei*, por melhor reproduzir as características observadas na MC humana (LOU et al., 2001).

O *P. berghei* foi isolado em 1948, por Vincke e Lips, em glândulas salivares da espécie silvestre de *Anopheles durenii*. Posteriormente, em 1950, o mesmo grupo descreveu a presença deste parasito no sangue de roedores silvestres *Grammomys surdaster*, *Praomys jacksoni*, e *Leggada bela* (BAGOT et al., 2002).

A maioria dos estudos provém do modelo de infecção por *Plasmodium berghei* ANKA (*PbA*), que apresenta uma divisão segura entre linhagens de camundongos resistentes (BALB/c e A/J) e susceptíveis (C57Bl/6 e CBA). Há evidências de que os camundongos susceptíveis apresentam importantes alterações morfológicas cerebrais, como ativação de células endoteliais e micróglia (DE SOUZA & RILEY, 2002;

LACKNER et al., 2006; DESRUISSEAU et al., 2008) e desenvolvam sinais neurológicos típicos da MC humana como paralisia, convulsão e coma, evoluindo para o óbito geralmente entre o oitavo e o décimo dia após a infecção (HUNT & GRAU, 2003; COMBES et al., 2005).

Em contrapartida, as linhagens resistentes exibem uma resposta diferente ao parasito, não desenvolvem MC e morrem, aproximadamente, 20 dias após a infecção devido à anemia grave e hiperparasitemia (DE SOUZA & RILEY, 2002). A cepa de *P. berghei* ANKA (*PbA*) é a mais utilizada nos modelos experimentais de MC por ativar o sequestro de células na microcirculação, desencadeando em baixa parasitemia uma infecção letal que evolui rapidamente para um quadro de malária cerebral (LOU ET AL.; 2001).

Para uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos nesta doença, têm sido utilizados modelos animais experimentais, sistema reproduzível e de fácil manipulação, que, apesar de não refletir exatamente as condições humanas, assemelha-se em alguns aspectos. Atualmente, camundongos C57BL/6 infectados com *PbA* são considerados o modelo murino experimental clássico de MC. Este modelo caracteriza-se por desenvolver, por volta do dia 6-7 de infecção, um padrão de sintomas típico de MC: ataxia, paralisia dos membros, convulsões e coma. (QUEIROZ, 2007). Vale ressaltar que nem todas as cepas de uma mesma espécie são capazes de induzir o quadro de MC (Quadro 1).

Quadro 1: Infecção por *Plasmodium* em diferentes linhagens de camundongos. (Adaptado de Queiroz et al., 2008)

PARASITA	CEPA	LINHAGEM DO CAMUNDONGO	LETALIDADE	USO EXPERIMENTAL
<i>P. chabaudi chabaudi</i>		CBA C57BL/6 BALB/c	Não letal	Mecanismo imune Sinais clínicos associados a malária e sequestro
	AS	129 X A/J DBA/2	Letal	Patogênese Quimioterapia Resistência e susceptibilidade Mecanismo imune
<i>P. chabaudi adami</i>	CB	CBA C57B1/6 C57X BALB/c	Não letal	Mecanismo imune
<i>P. berghei</i>	ANKA	C57BL/6 BALB/c CBA	Letal	Patogênese Malária cerebral experimental (MCE) Sequestro
	K173	C57BL/6 BALB/c CBA DBA	Letal	Controle para MCE e patogênese
<i>P. Yoelii</i>	17XL	C57BL/6 BALB/c CBA DBA Swiss	Letal	Mecanismo Imune Patogênese Sequestro Malária cerebral experimental (MCE)
	YM	C57BL/6 BALB/c CBA DBA	Letal	Vacina Patogênese Hipoglicemia Resposta imune Vacinação
	17 XNL	C57BL/6 BALB/c CBA DBA	Não letal	
<i>P. vinckei vinckei</i>		BALB/c	Letal	Sinais clínicos associados a malária e sequestro Patogênese Quimioterapia
<i>P. vinckei pessen</i>	CR	C57BL/6 BALB/c	Não letal	Mecanismos imunes

O ciclo assexuado do *P. berghei* é em geral assincrônico, com os diferentes estágios sanguíneos simultaneamente presentes no sangue no decorrer da infecção. Podem ocorrer infecções múltiplas de eritrócitos em que há poliparasitismo extensivo, apresentando massa citoplasmática com aparência contínua, com aspecto de esquizonte maduro (QUEIROZ, 2007).

A produção de merozoítos é variada de acordo com o estágio celular parasitado. De uma forma geral, a infecção em eritrócitos maduros produz de 6 a 12 merozoítos enquanto que em reticulócitos, pode chegar a 18.

A estrutura do *P. berghei* é bastante semelhante aos dos parasitas humanos. Assim como os esporozoítos humanos, o *P. berghei* também apresenta a capacidade de invadir hepatócitos. Resumidamente, a invasão se inicia por meio da invaginação da membrana plasmática da célula hospedeira, formando um vacúolo parasitóforo, que engloba o esporozoítos. Em um período que gira em torno de 4752 horas os esporozoítos evoluem até esquizonte maduro, podendo gerar 1500 a 8000 merozoítos. Após a ruptura da célula hepática os merozoítos são libertados na corrente sanguínea passando a invadir glóbulos vermelhos. Estudos não encontraram formas hipnozoítas de *P. berghei* no fígado (QUEIROZ, 2007).

Os merozoítos sanguíneos do *P. berghei* possuem semelhanças morfológica com os merozoítos de *Plasmodium* humano, tendo conservadas características relacionadas a invasão eritrocítica, tais como roptrias, micronemas, grânulos densos e proteínas de superfície que desempenham importante papel na invasão da célula. Após invadir o eritrócito, o merozoítos segue o seu desenvolvimento a trofozoíto, apresentando aumento no tamanho celular e citoplasmático. Assim como na infecção humana, o trofozoíto consome a hemoglobina, produzindo hemozoína, que pode ser vista como grânulos pigmentares no citoplasma.

O desenvolvimento até atingir o estágio de trofozoíto maduro leva cerca de 16 horas, e no final o parasita duplica seu DNA, seguindo para a divisão celular, e entra no estágio de esquizonte. Essa esquizogonia leva cerca de 6 a 8 horas, em que o parasito sofre seguidas replicações de seu DNA, dividindo seu núcleo, por meio endomitótico, em diversas vezes, originando uma célula sincicial com 8 a 24 núcleos. A duração total do desenvolvimento sanguíneo gira em torno de 22 a 24 horas, e esquizontes em eritrócitos maduros geralmente geram menos merozoítos que aqueles que se apresentam em reticulócitos (QUEIROZ, 2007).

1.6 ETNOBOTÂNICA, PLANTAS MEDICINAIS E A MALÁRIA

A Etnobotânica visa registrar o conhecimento tradicional e popular associado ao uso de plantas. Isto é fundamental para o resgate e preservação de um conhecimento biodiverso e altamente importante para a preservação da existência humana e para o desenvolvimento de novas tecnologias úteis diretamente ou indiretamente à sociedade. Segundo Elisabetsky (2000) um dos exemplos desta realidade são os medicamentos atualmente produzidos, que muitos deles são resultantes do acúmulo de conhecimento por povos tradicionais, através do uso de plantas medicinais.

Para Albuquerque (2002), a pesquisa Etnobotânica rompe de certa forma, com o discurso contemporâneo da ciência, principalmente quando postula que tanto as técnicas tradicionais como o conhecimento botânico popular, não são primitivos e inferiores; que o conhecimento tradicional botânico, como modo distinto de aprendizado, também é forma válida de conhecimento. Assim, a Etnobotânica deve possuir caráter transdisciplinar, como todas as áreas de atuação da Etnobiologia e Etnoecologia, sendo, portanto, seu objeto de estudo, as relações entre sociedades humanas e plantas (TOLEDO 1992, ALFARO 1994, COTTON 1996, SILVA 2003) de forma integrada.

As plantas medicinais são utilizadas por toda a humanidade desde sua origem para o tratamento de vários males e, ainda hoje, com o advento da aleloquímica, as plantas continuam sendo uma importante fonte para a descoberta de novos fármacos (DEHARO e GINSBURG, 2011). Aproximadamente 62% dos fármacos desenvolvidos entre 1981 e 2006 são derivados de substâncias naturais (NEWMANN e CRAGG, 2007). Várias espécies vegetais são utilizadas no tratamento direto ou como auxiliar em diversas doenças, tais como febres, malária e verminoses. Dentre estas doenças a malária destaca-se, seja pela frequência com que ocorre, seja pelos prejuízos que causa à saúde humana. (TOMCHINSKY, 2013). As drogas vegetais e as plantas medicinais são importantes fontes de agentes terapêuticos promissores para doenças infecciosas, distúrbios lipídicos e imunomodulação (ALTMANN, 2001).

A região amazônica sofre com a presença da malária há séculos, desde quando ela foi introduzida pelos colonizadores europeus. A presença desta doença na região reduziu a população indígena que nunca havia tido contato com ela. A floresta preservada dificilmente propicia as condições ideais para a propagação do vetor, mas quando esta é alterada rapidamente surgem estas condições. (TOMCHINSKY, 2013)

A presença de surtos da malária na região amazônica está ligada aos períodos de grande imigração humana, e aos grandes projetos de ocupação e infraestrutura como ferrovias, estradas, hidrelétricas e assentamentos agrários. Com o processo de ocupação desordenada da região amazônica, novos focos e surtos da malária têm ocorrido. Os assentamentos agrários levaram populações que nunca tiveram contato com a malária à região e o processo de derrubada das florestas para a ocupação humana criou condições ideais para a proliferação da doença (BRANDÃO et al. 1992, SVS, 2010).

A medicina tradicional é utilizada amplamente no controle da malária e é mais disponível que a medicina ocidental. Em torno de 50% dos pacientes com malária de todo o mundo fazem uso de plantas medicinais no tratamento da doença (WILLCOX e BODEKER, 2004). A medicina tradicional ainda é utilizada por diversos motivos em todo o mundo, entre eles a falta de acesso à medicina moderna, por fatores culturais, pela sua eficiência, por possuir menos efeitos colaterais ou pela desconfiança em relação aos medicamentos modernos (GRAZ et al. 2011).

Foram registrados de mais de 1.200 espécies de plantas para o tratamento da malária e de suas febres em todo o mundo (WILLCOX e BODOKER, 2004; RAOSOANAIVO, 2004). Enquanto não existirem vacinas ou outros métodos mais eficientes para a prevenção da malária e com o aumento no número de casos de resistência descritos em todo o mundo, as plantas medicinais continuam sendo a principal fonte na busca de novos remédios antimaláricos (TOMCHINSKY, 2013).

Vários métodos são utilizados para a padronização química de extratos vegetais: partição em solventes de polaridade diferente, separação e purificação cromatográfica em diferentes suportes, identificação química instrumental com técnicas variadas como: ressonância magnética nuclear, espectrometria de massa e outras (HANDA et al., 2008).

1.7 *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke (Aa) – Saracuramirá-

A. amazonicus (Saracuramirá) é uma liana lenhosa, com caule torcido, folhas com 3 a 5 nervuras de primeira ordem. Ocorre em áreas de baixio com adjacência declivosa, solos argilosos na parte superior e areno-argilosos na mais baixa, com poucas árvores emergentes (RIBEIRO et al., 1999). A planta apoia-se nos galhos de plantas-suportes e a diferenciação entre essa espécie e outras trepadeiras semelhantes é possível devido à cor

avermelhada de seu caule e pelo odor característico de salicilato de metila (NETTO, 2005).

Possui distribuição endêmica na América do Sul, ao longo dos territórios da Amazônia brasileira, venezuelana, colombiana e peruana, estendendo-se até o Equador. Sua ocorrência no Brasil limita-se aos estados do Amazonas, Pará e Roraima, sendo encontrada em florestas de terra firme (LIMA, 2006), preferencialmente, nas proximidades de igarapés e cachoeiras.

Em toda região amazônica a *Aa*, é tida como uma espécie de extrema importância na prevenção (BRANDÃO et al. 1985; VIEIRA 1992; KRETTLI et al. 2001; KRETTLI & ANDRADE-NETO 2004; SILVA et al. 2009) e no tratamento de malária (RODRIGUES, 1989; DUCKE & MARTINEZ 1994; SANTOS & MUAZE, 2002; OLIVEIRA 2004; RODRIGUES, 2006).

Considerada uma planta estimulante e energética (SANTOS et al. 2005), *Aa* apresenta ainda outras propriedades importantes descritas na literatura. Suas raízes são tidas como depurativas (RODRIGUES, 1989; VIEIRA, 1992; ALMEIDA, 1993), sendo também empregadas no tratamento de distúrbios gastrintestinais, inflamações e quadros de febre (RODRIGUES, 2006).

O pó das folhas de é indicado como cicatrizante (ALMEIDA, 1993; BERG, 1993). Suas cascas são utilizadas no preparo de um tônico fortificante (MEB, 1993) e afrodisíaco (BERG, 1993; SANTOS et al. 2005), como antídoto contraveneno de cobras na região amazônica (BRANDÃO et al. 1992), no tratamento de gastrite, dores nas juntas, “inflamações de mulher”, anemia e diabetes, como revitalizante, depurativo e diurético (OLIVEIRA, 2004). Foi comprovado em um estudo *in vivo* o efeito diurético da *Aa* em ratos (DINIZ et al. 2009).

Das cascas e raízes, pode ser preparada uma bebida aquosa com espuma abundante e de sabor amargo, semelhante à cerveja, o que lhe confere outros nomes populares como: “cervejinha”, “cervejeira”, “cerveja-do-mato” e “cerveja-de-índio” (RODRIGUES, 1989; VIEIRA, 1992; DUCKE & MARTINEZ, 1994; REVILLA, 2002; KRETTLI & ANDRADE-NETO, 2004; SANTOS et al., 2005). Essas propriedades estão relacionadas ao elevado teor de saponinas na espécie.

As saponinas, afetaram a diurese em ratos (MEYER et al., 2002). Diniz (2006) demonstrou que as saponinas extraídas de *A. amazonicus* possuem efeito antidiurético, sem afetar significativamente o ritmo de filtração glomerular. Este efeito envolveria a

diminuição da concentração urinária de urodilatina e aumento da atividade da Na⁺-ATPase. Um estudo demonstrou a presença de 48,4% de saponinas em um extrato aquoso das raízes de *Aa* (SILVA et al. 2009), sendo que algumas delas já foram isoladas e descritas na literatura, como: 3-O-[β-D-glicopiranosil (1→2) α-L-arabinopiranosil]- 20-O-α-L-ramnopiranosil-jujubogenina (Brandão et al. 1992), e ampelozigenina-15α-O-acetil-3-O-α-L-ramnopiranosil-(1→2)-β-D-glicopiranosídeo (BRANDÃO et al. 1993).

Além destas saponinas, foram descritas outras substâncias, como os triterpenos: ácido melalêucico, ácido 3β,27α-diidroxi-20(29)-em-28β-óico, ácido betulínico, betulina, o lupeol (BRANDÃO et al. 1992); e fitoesteróides (ROSAS et al. 2007).

Essa planta também apresentou atividade contra *Tripanossoma cruzi* em testes *in vitro*, além de possuir saponinas e triterpenos com ação sobre a diurese, comprovado em ratos (KRETTLI, 2001; ROSAS, 2007; DINIZ, 2009). Triterpenos pentacíclicos do grupo lupano, como lupeol, betulina, ácido betulínico e ácidos carboxílicos foram isolados de extratos clorofórmicos de *Aa* (BRANDÃO et al., 1992b). O lupeol também isolado de *Holarrhena floribunda* mostrou atividade antiplasmódio em linhagens de *Plasmodium falciparum* (FOTIE et al., 2006; KHALID et al., 1986);

Um estudo etnobotânico realizado por Oliveira et al 2011, o mostra a importância da *Aa* para as comunidades quilombolas do município de Oriximiná na prevenção da malária e na promoção da saúde, nas comunidades quilombolas de Oriximiná (figura 4).

No de Sistemas Corporais Tratados por uma Determinada Espécie (NSCE), conforme a CID-10	No de propriedades atribuídas à determinada espécie (NPE)
I - Algumas Doenças Infeciosas e Parasitárias	Malária
III - Doenças do Sangue, Órgãos Hematopoiéticos e Transtornos Imunitários	Anemia, depurativo do sangue
IV - Doenças Endócrinas, Nutricionais, Metabólicas	Diabetes
VI - Doenças do Sistema Nervoso	Tônico para os nervos, memória, afrodisíaco, falta de apetite
XI - Doenças do Aparelho Digestivo	Doenças do fígado, dores estomacais e purgativo
XIV - Doenças do Aparelho Gênito-Urinário	Inflamação de próstata, rins
XVIII - Sintomas, Sinais e Achados Anormais (Afecções Maldefinidas)	Indisposição
XX - Lesões, Envenenamentos e algumas Consequências de Causas Externas	Intoxicação

Figura 4: Propriedades de uso citadas pelos quilombolas de Oriximiná para a *A.a*, segundo a Classificação Internacional de Doenças e Problemas relacionados à Saúde – CID-10 (OMS 1998) Fonte: Oliveira et al 2011.

Medicinalmente apenas as cascas da Saracurimirá são utilizadas nessa região, o que torna o manejo da espécie mais fácil, diferente de outras comunidades amazônicas que fazem o emprego das raízes (KRETTLI et al. 2001). Além disso, o método utilizado para o preparo é frequentemente diferente da técnica de infusão, muito citada na literatura

(SANTOS E MUAZE, 2002; OLIVEIRA, 2004). A *A.a* é amplamente empregada pelos quilombolas como depurativa ajudando a “eliminar aquilo que não presta do organismo”, “limpando o sangue e o fígado”, previne, cura e impede o retorno da doença (OLIVEIRA et al 2011).

2. JUSTIFICATIVA

A malária é definida como uma doença infecciosa, não contagiosa, de evolução crônica, com manifestações episódicas de caráter agudo (BRASIL, 2013) e permanece como uma das doenças infecciosas mais prevalentes no mundo. A enfermidade é a causa da morte de mais de 10 mil grávidas e por volta de 200 mil infantes no continente. De acordo com o Relatório Mundial da Saúde (2015), vem ocorrendo uma redução significativa nas taxas de mortalidade cerca de 30% a 47% desde o ano 2000, contudo, a doença ainda representa um importante problema de saúde pública, o que justifica os estudos voltados para a elucidação dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos na patogênese da doença.

A malária cerebral (MC) é a patologia mais grave que pode resultar da infecção por *P. falciparum* nos humanos. Estima-se que em todo mundo ocorra anualmente 2,3 milhões de óbitos em decorrência dessa condição (SNOW et al., 2005) e que 10 a 17% dos que sobrevivem ao quadro de MC permanecem com algum déficit cognitivo e/ou comportamental (MURPHY E BREMAN, 2001). Estudo em modelos experimentais de MC têm sido de grande relevância, uma vez que mimetizam grande parte das alterações clínicas descritas em humanos e permitem investigar fatores envolvidos na patogênese dessa condição (DE SOUZA & RILEY, 2002; LACERDA-QUEIROZ et al., 2010).

As plantas representam uma fonte importante para a pesquisa de novos princípios ativos para o tratamento da malária; várias plantas já foram citadas com esta propriedade, mas poucas destas foram efetivamente testadas e por isso são necessárias pesquisas multidisciplinares e interdisciplinares na pesquisa de novos remédios antimaláricos (MARIATH et al., 2009). É essencial que se investiguem outras plantas medicinais utilizadas tradicionalmente como antimaláricas, de modo a comprovar a sua eficácia, segurança e o seu potencial como novos fármacos antimaláricos (GESSLER et al., 1994; WILLCOX E BODEKER, 2004). No município de Oriximiná é comum o uso de plantas medicinais para o uso de várias doenças, incluindo a malária. A partir daí, realizou-se um estudo prévio em duas comunidades quilombolas do Município de Oriximiná/PA: Araçá de Fora (Rio Erepecurú) e Tapagem (Rio Trombetas), afim de identificar os vegetais utilizados, a indicação do tratamento e as formas de preparo, através de visitas às comunidades. A partir desse estudo, observamos que a *Aa* foi citada como planta medicinal utilizada para o uso do tratamento da malária em ambas as comunidades

(Tabelas 1 e 2), permitindo assim realizar um estudo farmacológico dessa planta para validação de seus efeitos em modelo murino de malária Cerebral experimental.

3. OBJETIVOS

3.1. GERAL

- ✓ Realizar um estudo etnomedicinal e avaliar o efeito do tratamento com *Ampelozizyphus amazonicus* (*Aa*) na evolução do quadro de malária murina induzida pela infecção com cepa ANKA de *Plasmodium berghei* (*PbA*).

3.2. ESPECÍFICOS

1. Demonstrar a indicação do tratamento e as formas de preparo da *Aa*, estabelecendo diferenças ou semelhanças na forma de utilização da mesma em Comunidades Tradicionais do município de Oriximiná-PA;
2. Caracterizar o quadro clínico e verificar o efeito do extrato de *Aa* nas doses de 10 mg/Kg e 20mg/kg sobre o desenvolvimento do quadro de malária de acordo com a progressão da infecção, a partir da determinação da curva de sobrevivência, níveis de parasitemia e alteração no ganho de massa corpórea em camundongos C57BL/6 inoculados com *PbA* e/ou tratados com *Aa*.
3. Qualificar e quantificar o peso úmido do fígado dos animais infectados com *PbA* e/ou pré-tratados com *Aa* nas doses de 10 e 20mg/kg *Aa* no 10º dia pós infecção.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 PESQUISA ETNOMEDICINAL EM COMUNIDADES QUILOMBOLAS

O município de Oriximiná localiza-se no Oeste do Pará, às margens do rio Trombetas. Limita-se com os municípios de Terra Santa, Faro, Juruti e Óbidos, com o Estado de Roraima, com a Guiana e o Suriname. O município possui 33 comunidades quilombolas, distribuídas em oito regiões distintas: Boa Vista, Água Fria, Trombetas, Erepecurú, Alto Trombetas, Ariramba, Jamari/Último Quilombo e Moura. O trabalho foi realizado nas comunidades Tapagem (Trombetas) e Araçá de Fora localizada no Rio Erepecurú (Figura3).

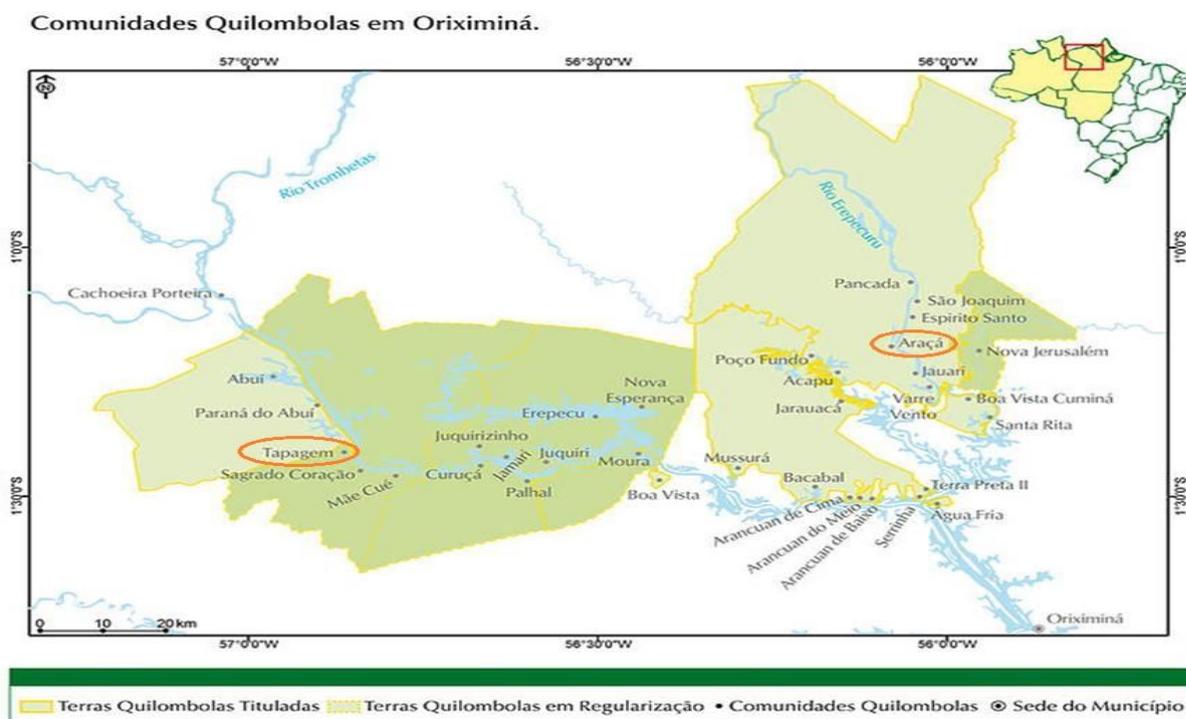


Figura 5: Localização geográfica das comunidades quilombolas Tapagem localizada no Rio Trombetas e Araçá de fora localizada no Rio Erepecurú

Foram realizadas visitas às comunidades quilombolas, do Município de Oriximiná/PA: Araçá de Fora (Rio Erepecurú) e Tapagem (Rio Trombetas), no ano de 2011 e os comunitários foram esclarecidos sobre as pretensões da investigação em reuniões informativas à comunidade. Inicialmente houve a apresentação de um Workshop sobre Bioprospecção e plantas medicinais, onde abordavam temas sobre uso e cultivo de plantas medicinais, orientando os mesmos sobre cuidados no manuseio de plantas. Após

esse momento, houve a assinatura de “termo de consentimento livre e esclarecido”, dos moradores que aceitaram prestar as informações sobre o uso de plantas medicinais (vegetais utilizados, a indicação do tratamento e as formas de preparo) na comunidade e em seguida os moradores foram questionados sobre indicação, forma de utilização e preparo das plantas medicinais mais utilizadas pelos mesmos.

Apresentou-se uma lista de enfermidades e sintomas mais comuns, e também foram questionados sobre outros tratamentos não mencionados na lista prévia. Após conversas informais, a liderança da comunidade foi incumbida de mobilizar as pessoas que mostravam considerável conhecimento referente aos recursos vegetais de uso terapêutico na comunidade. Posteriormente, identificamos quais plantas eram indicadas para o tratamento da malária para coletar e realizar testes experimentais.

4.2. MATERIAL VEGETAL

4.2.1 COLETA, IDENTIFICAÇÃO E EXSICATA

A liana *Aa* foi coletada na comunidade quilombola da Tapagem - Oriximiná-Pa, em Fevereiro de 2016. Os caules foram acondicionadas em saco plástico para transporte, pesadas e levadas ao laboratório de Síntese e Cromatografia sob responsabilidade do Prof^o Dr^o Lourivaldo Santos na Universidade Federal do Pará - UFPA para preparação dos extratos. Os caules foram deixados em bancada por 2 dias, à temperatura ambiente, no Laboratório de Síntese e Cromatografia, para uma secagem preliminar. Em seguida, as cascas e entrecasas foram fragmentadas e foram secas em estufa (QUIMIS) com corrente de ar a aproximadamente 45 °C até secar completamente e atingir peso constante. Depois de secas, as cascas e entrecasas foram pulverizadas separadamente em moinho de facas inoxidável (MARCONI) com tela média até a obtenção de um pó e este, após tamisação, foi classificado como pó grosso (Caule) e pó fino (Entrecasca)



Figura 6: Processamento do material vegetal. Caule de *A. amazonicus* - caule e entrecasca- (A); Estufa de secagem do material vegetal (B); Moinho e tela para obtenção do Pó (C); Pó de *A. amazonicus* -Caule e entrecasca- (D).

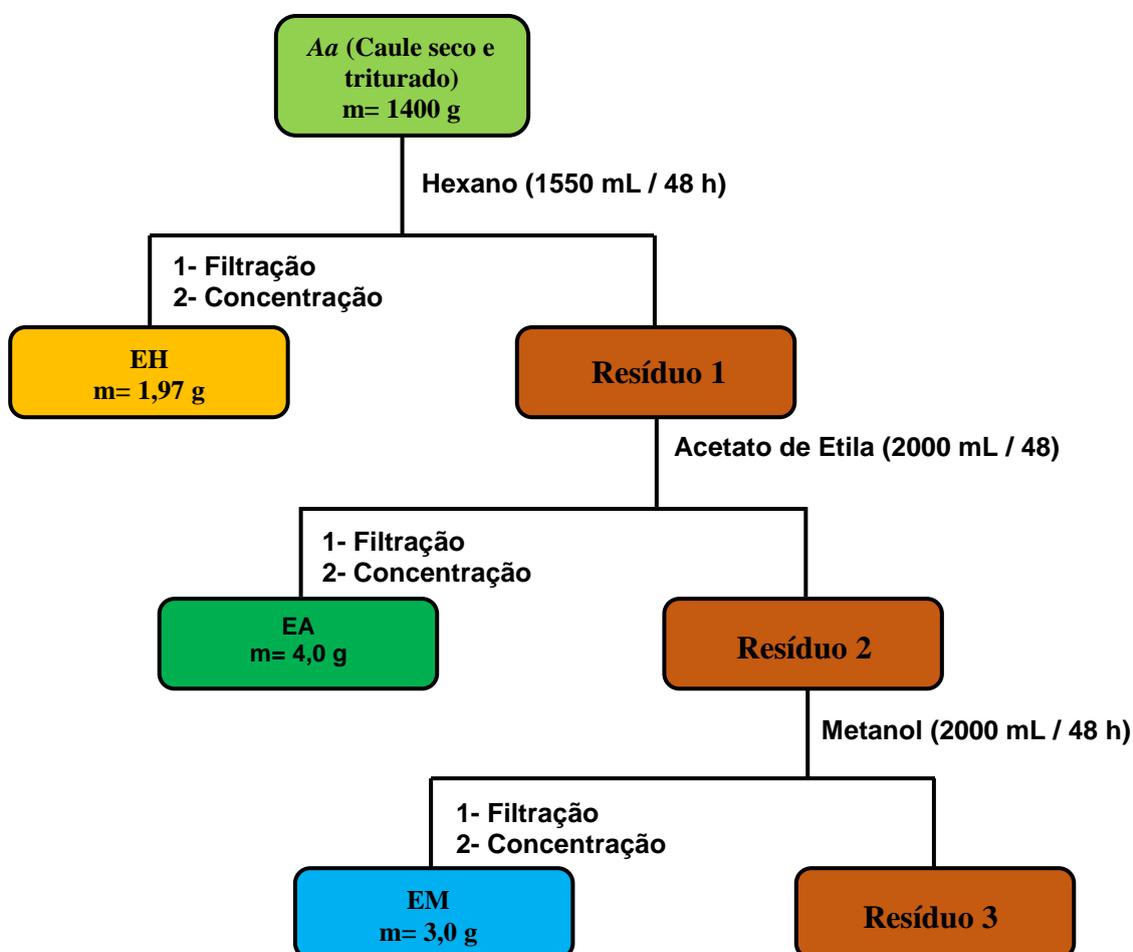
A determinação botânica foi realizada no herbário da Embrapa, na cidade de Belém – PA. A amostra foi comparada com a exsicata da espécie, e depositada na coleção botânica do herbário sob o nº de registro 195.919, nº de coletor 01.

4.2.2. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

Para o desenvolvimento deste estudo foram utilizados caules de *A. Amazonicus* moído em pó. A obtenção dos extratos foi realizada por percolação utilizando solventes em ordem crescente de polaridade. Foram utilizados solventes de diferentes polaridades, em ordem crescente de polaridade (n-hexano, acetato de etila e metanol). Todos os solventes utilizados apresentavam padrão analítico.

Foram utilizados 1400 g do caule seco e triturado, em seguida foi submetido à extração adicionando Hexano que ficou em repouso durante 48 h, após esse período foi filtrado e concentrado em evaporador rotativo, sendo obtido o extrato hexânico (EH). Na torta (resíduo) foi adicionado acetato de etila ficando em repouso por período igual, após esse tempo foi realizada a filtração e concentração, para a obtenção do extrato de acetato

(EA). E por último foi acrescentado metanol, o filtrado foi concentrado e assim sendo obtido o extrato metanólico (EM), (Fluxograma 1).



Fluxograma 1: Extração (percolação) dos extratos de *A. amazonicus* em solventes de polaridades crescentes.

Os extratos resultantes foram filtrados utilizando folhas de papel de filtro Whatman® analítico em funil e frasco de Erlenmeyer, e deixados em capela de exaustão evaporação dos solventes por 48 horas, em seguida os extratos foram concentrados em evaporador rotativo (modelo Q-344-2 QUIMIS equipado com bomba de vácuo modelo TE-058) a 45° C (Figura 6). Durante a obtenção do extrato em Acetato de Etila do caule ocorreu a formação de um precipitado amarelo-esverdeado.

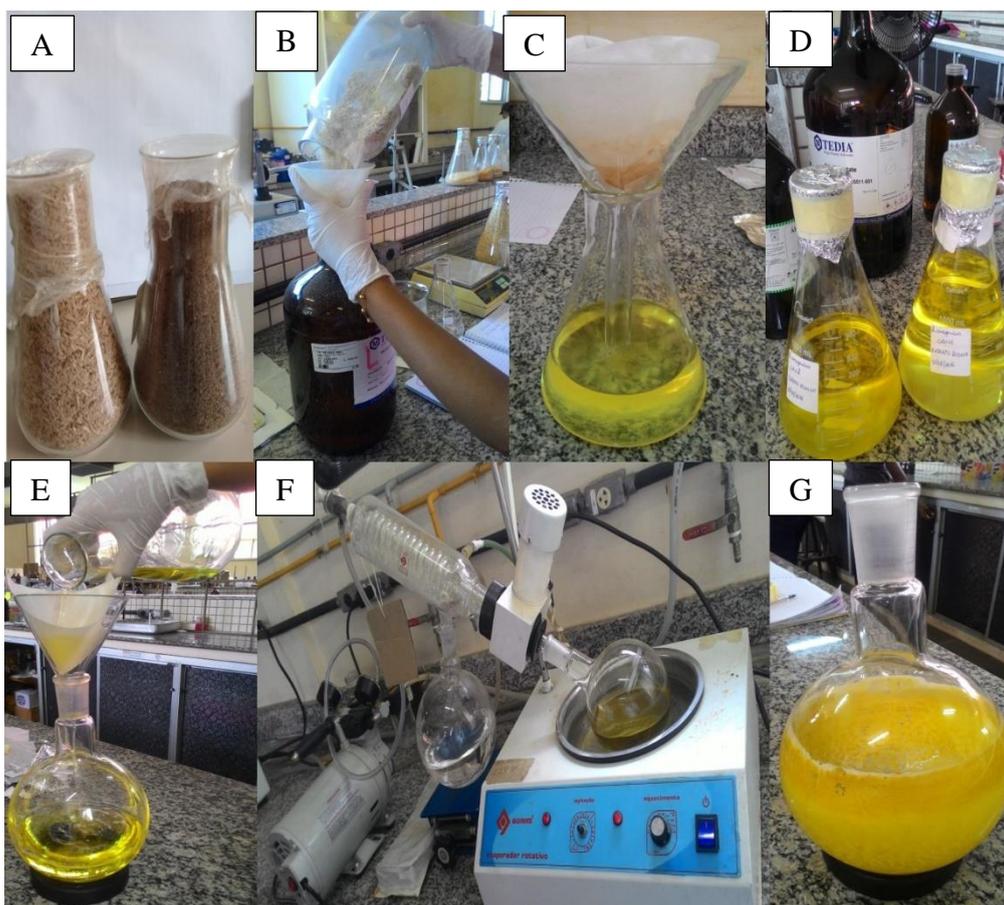


Figura 7: Processo de preparação dos extratos (Extração, filtração e concentração). (A) Pó do caule e da entrecasca de *A.a*; (B) Extração do pó (g) do caule ou entrecasca de *A.a* em solventes; (C) Filtragem do extrato após 48h de extração; (D) Extratos pronto para concentração; (E; F) Concentração dos extratos em evaporador rotativo; (G) massa após a concentração em evaporador rotativo.

Após a concentração dos extratos em evaporador rotativo, o material foi transferido para frascos de vidro de boca larga e levado à estufa a 40 °C por 2 dias para evaporação dos solventes. Os extratos concentrados resultantes (EH, EA e EM) foram mantido em refrigerador, em frascos protegido da luz.

4.3 ANIMAIS

Neste estudo foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) adultos, machos e fêmeas da linhagem C57BL/6, adquiridos do biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, com 42 a 56 dias pós-natal e aproximadamente 18 ± 5 g de massa corpórea. Os camundongos foram mantidos em gaiolas coletivas em grupos de no máximo oito animais, em condições assépticas, com água e ração à vontade e sob

condições de luz (ciclo claro/escuro de 12/12 horas) e temperatura ambiente controlada (24/25°C)

4.4 NORMAS ÉTICAS

As normas éticas para pesquisa com animais de laboratório foram respeitadas, estando este projeto aprovado pelo Comitê de Ética de Uso de Animal (CEUA) parecer 191-14

4.5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Para caracterização o quadro clínico de malária a partir da determinação da curva de sobrevivência, níveis de parasitemia e alteração no ganho de massa corpórea e verificação do efeito do extrato de *Aa* nas doses de 10 e 20mg/kg em camundongos C57BL/6 inoculados com a cepa ANKA de *Plasmodium berghei* (*PbA*) e/ou pré-tratados com o extrato de *Aa* (Experimento A), os animais foram divididos em grupos controle (n=4;7): submetidos à administração i.p de 100µl de PBS, ao tratamento com 100 µl do extrato de *Aa* nas doses de 10 e 20mg/Kg ou DMSO a 2% com o intuito de verificar se a administração do extrato em acetato e o veículo (DMSO) não estariam ocasionando algum dano ao animal; grupo infectado (n=14): submetidos à administração i.p de PBS; e os grupos infectados + tratamento (n=14): submetidos à administração i.p de um pré-tratamento de 4 dias consecutivos com o extrato de *Aa* nas doses de 10 e 20mg/Kg (n=14) + tratamento a partir do dia 0 pós-infecção durante 4 dias consecutivos, somando 8 dias de tratamento no total (Tabela 1).

Para a realização da hepatectomia, com o intuito de avaliar o estabelecimento da hepatomegalia através do peso úmido do fígado 10 dias pós-infecção, (Experimento B) os animais foram divididos em grupos controle (n=4): submetidos à administração i.p 100µl de PBS, tratamento com o extrato de *Aa* nas doses de 10 e 20mg/Kg ou DMSO a 2%; grupo infectado (n=8): submetidos à administração i.p de 100 µl PBS; e os grupos infectados + tratamento (n=8): submetidos à administração i.p de um pré-tratamento de 4 dias consecutivos com o extrato de *Aa* nas doses de 10 e 20mg/Kg (n=14) + tratamento a

partir do dia 0 pós-infecção durante 4 dias consecutivos, somando 8 dias de tratamento no total (Tabela 1).

Tabela 1: Delineamento dos grupos experimentais de acordo com os tratamentos:
**Plasmodium berghei* ANKA (PbA); extrato de Aa nas doses de 10 e 20mg/kg

Experimento A		Experimento B	
GRUPOS	TRATAMENTO	GRUPOS	TRATAMENTO
	A. a 10 mg/Kg (n=7)		PBS
CONTROLE	A.a 20 mg/Kg (n=7);	CONTROLE	A. a 10 mg/Kg (n=4)
	DMSO a 2% (n=4)		A.a 20 mg/Kg (n=4);
INFECTADOS	PbA (n=14)	INFECTADOS	PbA (n=8)
	PbA + A. a 10 mg/Kg (n=14)		PbA + A. a 10 mg/Kg (n=8)
	PbA +A.a 20 mg/Kg (n=14);		PbA + A.a 20 mg/Kg (n=8);

4.6 TRATAMENTO COM *Ampelozizyphus amazonicus* (SARACURA MIRÁ)

O resultado final do extrato foi diluído em DMSO a 2% e administrado por via intraperitoneal (i.p) por 8 dias (quatro dias de pré-tratamento e 4 dias de tratamento) nas doses de 10 mg/Kg e 20 mg/kg.

4.7 INDUÇÃO DO QUADRO DE MALÁRIA EXPERIMENTAL COM *P. berghei* ANKA

Para indução da malária foi utilizada a cepa ANKA de *Plasmodium berghei*. Inicialmente, uma alíquota de sangue foi descongelada e inoculada em um camundongo da linhagem C57BL/6 por injeção intraperitoneal (i.p). Ao atingir entre 8-12% de parasitemia, o sangue desse camundongo foi coletado por punção cardíaca com o auxílio

de uma seringa de insulina heparinizada, e inoculado outro camundongo C57BL/6 que ao atingir entre 8-12 % de parasitemia, o sangue foi coletado por punção cardíaca com o auxílio de uma seringa de insulina heparinizada e realizado a quantificação dos eritrócitos parasitados, que foi determinada pela contagem em câmara de Neubauer através do número total de eritrócitos em suspensão pela porcentagem de parasitemia.

Para a realização da punção cardíaca, os animais são anestesiados com Cetamina 0,1 mg/mL e Xilazina 0,023 mg/mL. Através de injeções intraperitoneais, os animais foram sedados nas doses de 50 mg/Kg de Cetamina e 15mg/kg de Xilazina e, em seguida, foi coletado o sangue do camundongo infectado em seringa. Foi retirado 20µl do sangue coletado e adicionado a 3980µl de PBS em seguida foi retirado 10 µl dessa solução para contagem dos eritrócitos em suspensão em câmara de Newbauer.

Após a contagem das células em suspensão em câmara de Newbauer, foi retirado uma alíquota do sangue coletado, diluído em PBS e posteriormente 100µl dessa mistura com aproximadamente 1×10^6 de células infectadas por *P. berghei* foi injetado em cada animal por via intraperitoneal (i.p), para garantir um grau de infecção uniforme nos diferentes grupos (GRAU et al., 1986). Para avaliar a evolução do quadro, foi realizado o acompanhamento de sobrevivência, variação de massa corpórea e evolução da parasitemia dos camundongos C57BL/6 inoculados com a cepa ANKA de *Plasmodium berghei* nos dias pós-infecção em todos os grupos.

4.7.1 ANÁLISE DA SOBREVIVÊNCIA

A análise de sobrevivência foi realizada diariamente por meio de acompanhamento dos grupos experimentais, observando a sobrevida em períodos e intervalos idênticos (Long rang test). A curva de sobrevivência foi obtida a partir da determinação do número de animais que evoluíram a óbito em seus respectivos dias pós-infecção (d.p.i).

4.7.2 ACOMPANHAMENTO DE MASSA CORPÓREA

A quantidade de M. C dos animais foi acompanhada nos dias de pré tratamento e nos dias 3°, 5°, 7°, 9°, 11°, 12° após a infecção. Para tal avaliação, os animais foram pesados em balança analítica, com os camundongos sob quatro patas na superfície da balança.

4.7.3 AVALIAÇÃO DA PARASITEMIA

Para avaliação dos níveis de parasitemia, nos dias 3°, 5°, 7°, 9°, 11°, 12° após a infecção foi retirada uma gota de sangue (1µl) da veia caudal do animal e colocada em uma lâmina (extensão sanguínea). Em seguida, a lâmina foi incubada com metanol por 10 min para posterior coloração por Giemsa a 5% durante 20 min, lavada em água corrente e seca à temperatura ambiente.

A parasitemia foi analisada pela contagem de células parasitadas X 100/ pelo total de células (1000 hemácias no total), nas diferentes fases do plasmódio de acordo com a progressão da infecção. As lâminas foram analisadas em microscópio óptico (NIKON, modelo E200) com óleo de imersão (1000x maximização final). As contagens das células foram realizadas com auxílio do programa ImageJ, o que garante uma maior precisão no Percentual de parasitemia de cada animal. A determinação da parasitemia foi realizada de 3 em 3 dias, até que o animal evoluísse a óbito.

Foram consideradas hemácias infectadas, as células que apresentarem os plasmódios em formatos de anel, formatos puntiformes na extremidade da célula, presença de esporosóito no interior da hemácia e esquizonte conforme a figura 8:

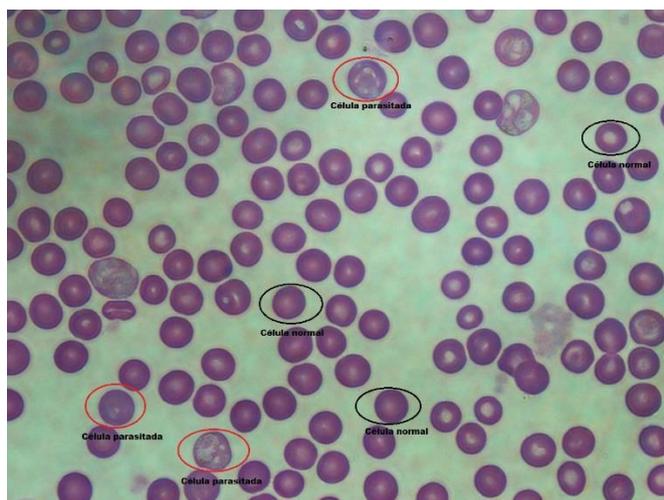


Figura 8: Extensão sanguínea de camundongo m camundongos C57BL/6 inoculados com a cepa ANKA de *Plasmodium berghei* (PbA). Em destaque podem ser observadas células normais e parasitadas.

3.8 PESAGEM DO FÍGADO

Para a realização da hepatectomia, as substâncias-testes, em suas concentrações a serem testadas foram administradas via intraperitoneal, por 8 dias – Pré-tratamento/tratamento (Grupo 1 – Extrato de *A. a* 10 mg/Kg + PbA (N=4); Grupo 2 – Extrato de *A. a* 20 mg/Kg + PbA (N=4); Grupo 3 - PbA + PBS (N=7); Grupo 4 – Extrato de *A. a* 10 mg/Kg (N=8); Grupo 5– Extrato de *A.a* 20 mg/Kg (N=8), (Experimento B – tabela 3). Os grupos foram acompanhados diariamente, monitorando os parâmetros de sobrevivência, massa corpórea e parasitemia no 3º, 5º, 7º e 9º pós-infecção e, no 10º pós-infecção, os animais foram anestesiados com xilazina e Cetamina (i.p.) e sacrificados, sendo feito a coleta do fígado para uma verificar se existiam diferenças entre os grupos na massa do fígado de camundongos C57BL/6. O fígado dos animais foi pesado em balança analítica.

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram analisados pelo ANOVA (análise de variância) seguido do pós-teste *Tukey-Kramer* (para análise de três ou mais grupos). A análise de sobrevivência foi realizada utilizando o teste Kaplan-Meier log rank test (Mantel-Cox). A significância estatística das diferenças entre as médias de cada grupo foi analisada pela análise de variância unidirecional (ANOVA) (software Graphpad Prism 6). Os dados são apresentados como a média \pm S.E.M. (Erro padrão da média, n=7 por grupo). O valor de $P < 0.05$ foi considerado significativo. O resumo do valor P é mencionado como * $P < 0.05$; Ns - não significativo.

6. RESULTADOS

6.1 PESQUISA ETNOMEDICINAL EM COMUNIDADES QUILOMBOLAS

As informações foram obtidas por meio de visitas às comunidades quilombolas do Município de Oriximiná/PA: Araçá de Fora (Rio Erepecurú) e Tapagem (Rio Trombetas), com a devida assinatura do “termo de Consentimento livre e esclarecido”. Após conversas informais, a liderança da comunidade foi incumbida de mobilizar as pessoas que mostravam considerável conhecimento referente aos recursos vegetais de utilizados como recurso terapêutico na comunidade. É notável a importância das plantas de uso medicinal para os moradores das comunidades Araçá de Fora e Tapagem que apresentam conhecimento diversificado sobre as mesmas. Dentre as etnoespécies de uso medicinal citadas, 28 apresentaram maior índice de citação (4-5 vezes citadas pelos moradores). Existe similaridade entre as duas comunidades em relação às formas de uso e indicação do tratamento das plantas como podemos observar nas tabelas 2 e 3.

Tabela 2. Lista das etnoespécies de uso medicinal na comunidade de Tapagem no Alto Trombetas/Oriximiná/ Pará.

Nome popular	Nome Científico	Indicação (Uso)	Parte Utilizada (droga vegetal)	Forma de Utilização (Preparo)
Açaí	<i>Euterpe precatória</i>	Anemia	Raiz	Chá
Alho	<i>Allium sativum</i>	Febre/Vômito/gripe	Dente	Chá
Andiroba	<i>Carapa guianensis</i>	Inflamação/Dor de dente	Óleo	Pomada
Arruda	<i>Ruta graveolens L.</i>	Derrame/pneumonia e reumatismo	Folhas	Chá
Boldo	<i>Plectranthus barbatus</i>	Fígado e dor de estômago	Folhas	Chá
Chicória	<i>Cichorium endívia</i>	Gripe	Folhas	Chá
Cipó alho	<i>Pachyptera alliacea</i>	Quebranto/Mal olhado	Folhas	Banho
Cumarú	<i>Dipteryx odorata</i>	inflamação nos rins e fortalece os nervos	Casca	Chá/extrato
Elixir paregórico	<i>Piper callosum L</i>	Estomago	Folhas	Chá
Eucalipto	<i>Eucalyptus sp.</i>	Dor de cabeça e febre	Folhas	Chá
Jambú	<i>Spilanthes acmella</i>	Vômito/estômago	Folhas	Chá
Lima	<i>Citrus aurantifolia</i>	Pressão	Folhas	Chá
Manaiara	<i>Chenopodium ambrosioides</i>	Banho de asseio/diarreia	Casca	Banho
Mastruz	<i>Chenopodium ambrosioides</i>	Fraqueza/Verme/estômago	Folhas	Chá/Suco de Clorofila
Pimenta do Reino	<i>Piper nigrum</i>	Cólicas menstruais	Semente	Chá
Salva de Marajó	<i>Hyptis crenata</i>	Cólicas menstruais/estômago	Folhas	Chá
Saracuramirá	<i>Ampelozizyphus amazonicus Ducke</i>	Malária	Raspa das Casca	Extrato aquoso
Unha de Gato	<i>Uncaria tomentosa</i>	Inflamação	Casca	Chá
Urucum	<i>Bixa Orellana</i>	Anemia	Raiz	Chá

Tabela 3: Lista das etnoespécies citadas como recurso medicinal, parte utilizada, indicação na comunidade do Araçá de Fora no Rio Erepecurú/ Oriximiná/ Pará.

Nome popular	Nome Científico	Indicação (Uso)	Parte Utilizada (droga vegetal)	Forma de Utilização (Preparo)
Abacate	<i>Persea americana</i>	Anemia	Folhas	Chá
Aroeira	<i>Astronium lecointei</i>	Fígado/Inflamação	Casca	Chá
Crajirú	<i>Arrabidaea chica</i>	Anemia	Folhas	Chá
Cumarú	<i>Dipteryx odorata</i>	Derrame/pneumonia	Folhas	Chá
Envirataia	<i>Xilopia</i> sp.	Quebranto e Mal olhado	Folhas	Chá
Manjeriçã	<i>Ocimum basilicum</i>	Banho espiritual e banho de cheiro	Folhas	Banho
Quebra pedra	<i>Phyllanthus niruri</i>	Infecção urinária e banho de asseio	Folhas	Chá
Sara tudo	<i>Byrsonima intermedia</i>	inflamação no útero/Anemia	Folhas	Chá
Saracuramirá	<i>Ampelozizyphus amazonicus</i>	Malária	Raspa das Casca	Extrato aquoso
Vindicá	<i>Alpinia zerumbet</i> (Pers.)	Coração, sinusite, e banho contra “pissica” (Azar)	Folhas/Cascas	Chá/Banho

Podemos observar (tabela 2) que na comunidade Araçá de Fora, os sintomas mais citados para utilização de tratamento medicinal alternativo estão relacionados à dor ou inflamação, com 8 recursos citados (Andiroba, Arruda, Boldo, Cumarú, Eucalipto, Pimenta-do-Reino, Salva do Marajó, Unha de gato). Quanto ao número de citações dos recursos vegetais utilizados no tratamento medicinal - Dados não apresentados – Alho, Arruda, Boldo, Cumarú e Jambú e Saracuramirá, tiveram maior frequência nas indicações relatadas. Na comunidade Tapagem (tabela 3), as indicações mais frequentes foram inflamação, anemia e alterações espirituais (quebranto, mal olhado e azar), sendo que a Envirataia e o Vindicá que tiveram maior frequência nas citações dos comunitários – Dados não apresentados - A indicação do tratamento com plantas medicinais para sintomas de inflamação geral (dor e febre) está presente em ambas as comunidades e

surpreendentemente a *Aa* foi citada como única planta de uso medicinal indicada para o tratamento malária, mostrando sua grande importância medicinal em ambas as comunidades quilombolas. Dessa forma, demonstramos aqui, não só a importância do uso de plantas medicinais nas duas comunidades quilombolas (identificando os vegetais utilizados, a indicação do tratamento e as formas de preparo), como também demonstramos que o uso da *A. amazonicus* é de grande importância e está presente em ambas as comunidades quilombolas, o que justificou selecioná-la para o estudo farmacológico em modelo murino.

6.2. CARACTERIZAÇÃO DO QUADRO DE MALÁRIA E AVALIAÇÃO DOS POSSÍVEIS EFEITOS DE *Aa*

6.2.1 SOBREVIVÊNCIA DOS ANIMAIS APÓS INFECÇÃO POR *PbA*

Foi avaliado o curso temporal da doença obtido a partir do monitoramento diário da taxa de sobrevivência desses animais após o início da infecção com o intuito de padronizar o desenvolvimento do quadro de malária nos grupos inoculado com a cepa *PbA* auxiliando assim na caracterização dos efeitos de *Aa* na evolução do quadro clínico da malária experimental. A sobrevivência dos animais infectados por *PbA* foi analisada de acordo com a contagem dos dias após a infecção. Os indivíduos dos grupos infectados, foram analisados até evoluírem a óbito no decorrer do experimento. Os animais infectados, foram a óbito a partir do 9º dia pós-infecção e o último animal dos grupos pré-tratados/tratado com *Aa* sobreviveram até o 13º dia após a infecção.

Durante este período, foi possível observar que a inoculação dos camundongos C57BL/6 com a cepa *PbA* resultou em uma infecção aguda e letal que se iniciou no 9º d.p.i., mantendo-se até o 13º d.p.i., com uma significativa diminuição na taxa de sobrevivência entre 11º e o 13º d.p.i., (Gráfico 1).

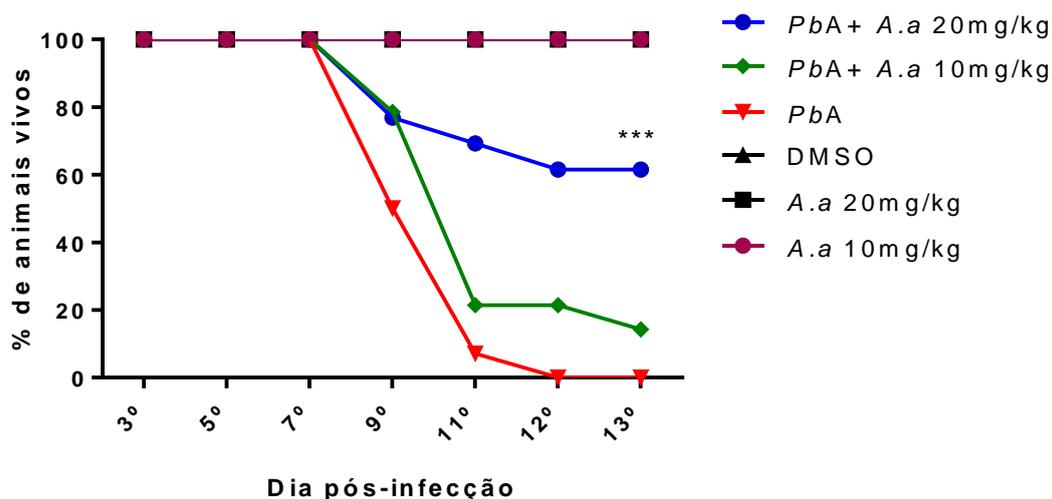


Gráfico 1: Curva de sobrevivência dos camundongos C57BL/6 do grupo veículo (DMSO); extrato de *A.a* 10 mg/Kg e extrato de *A.a* 20 mg/Kg e dos grupos inoculados com *P. berghei* ANKA (*PbA*) por injeção intraperitoneal de 10^6 de eritrócitos parasitados e tratados por 8 dias (pré-tratamento/tratamento de 4 dias) com *A.a* 10 mg/Kg e 20mg/Kg ou PBS, acompanhados até o 12º pós-infecção (n=7;4;14): *PbA*+ Extrato de *A.a* 10 mg/Kg; *PbA*+ Extrato de *A.a* 20 mg/Kg, *PbA* acompanhados até o 13º pós-infecção. A análise de sobrevivência foi realizada utilizando o teste Kaplan-Meier log rank test (Mantel-Cox). Dados representados por média + EPM (n=14). * $p < 0,05$. *PbA* vs *PbA* + *A.a* 10mg/kg $p = 0,3690$ (Ns); *PbA* vs *PbA* + *A.a* 20mg/kg $p = 0,0173$ ($p < 0,05$, *PbA* + *A.a* 10mg vs *PbA* + *A.a* 20mg $p = 0,0442$ ($p < 0,05$).

Nossos resultados mostram um aumento significativo da sobrevivência nos animais do grupo *PbA*+ Extrato de *A.a* 10 mg/Kg e *PbA*+ Extrato de *A.a* 20 mg/Kg comparados ao grupo *PbA* que foram acompanhados até o 13º dia.

No 9º dia pós infecção, o grupo infectado com a cepa *PbA* possuía 50 % dos animais vivos, enquanto que os grupos *PbA*+ *A.a* 10 mg/Kg e *PbA*+ *A.a* 20 mg/Kg representavam 78 e 76% respectivamente. No 11º dia o grupo *PbA* possuía apenas 7,42% (quando o último animal do grupo veio a óbito), enquanto que os grupos *PbA*+ *A.a* 10 mg/Kg e *PbA*+ *A.a* 20 mg/Kg possuíam 42,85 e 61,53% respectivamente. No 13º dia pós-infecção, os animais dos grupos *PbA*+ *A.a* 10 mg/Kg e *PbA*+ *A.a* 20 mg/Kg possuíam ainda 21,42% e 53,88 % dos animais vivos.

Não houve diminuição da sobrevivência dos animais não infectados (grupo *A.a* 10 mg/kg, *A.a* 20mg/Kg e DMSO) com a cepa *PbA*, como já era esperado.

6.2.2 EVOLUÇÃO DA MASSA CORPÓREA DOS ANIMAIS

Para confirmar o estabelecimento do modelo de malária e caracterizar o desenvolvimento do quadro de malária, avaliou-se possível alteração no ganho de massa corpórea dos animais grupos: *PbA*+ Extrato de *A.a* 10 mg/Kg; *PbA*+ Extrato de *A.a* 20 mg/Kg, *PbA*, do grupo veículo (DMSO); extrato de *A.a* 10 mg/Kg e extrato de *A.a* 20 mg/Kg.

A massa corpórea foi acompanhada no período de tratamento e mensurada após a infecção por *PbA* (Gráfico 2) no 3º, 5º, 7º, 9º, 11º e 12º dia pós-infecção dos grupos inoculado com a cepa *PbA*, permitindo observar se a infecção com a cepa *PbA* ocasionou alteração no ganho de massa corpórea dos camundongos C57BL/6 no decorrer da evolução da doença.

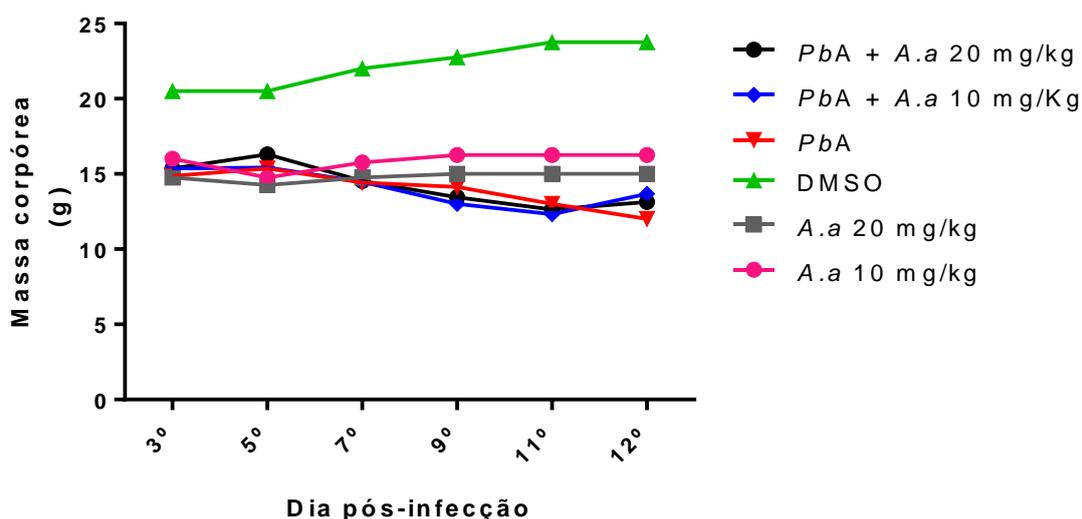


Gráfico 2: Acompanhamento de massa corpórea dos camundongos C57BL/6 do grupo veículo (DMSO); extrato de *A.a* 10 mg/Kg e extrato de *A.a* 20 mg/Kg e dos grupos inoculados com *P. berghei* ANKA (*PbA*) por injeção intraperitoneal de 10^6 de eritrócitos parasitados e tratados por 8 dias (pré-tratamento/tratamento de 4 dias) com *A.a* 10 mg/Kg e 20mg/Kg ou PBS, acompanhados até o 12º pós-infecção (n=7;4;14): *PbA*+ Extrato de *A.a* 10 mg/Kg; *PbA*+ Extrato de *A.a* 20 mg/Kg, *PbA*.

Em relação às perdas de massa corpórea dos grupos (controle): Extrato de *A.a* 10 mg/Kg; *A.a* 20 mg/Kg e *PbA*, observamos que o grupo preservou a massa corpórea dos animais por mais tempo e mantiveram-se estáveis até 12º dia quando comparados ao

grupo infectados, não se observando assim perdas significativas de massa entre esses grupos.

No grupo dos animais infectados pelo plasmódio, seis dias após a inoculação já foram detectadas perdas de massa corpórea em relação ao grupo controle. Houve uma diminuição da massa corpórea gradativamente de acordo com a progressão da infecção, e essas perdas da massa corpórea em todos grupos infectados continuaram até o 12º dia de infecção por *PbA* conforme a evolução da doença, não havendo diferença significativa entre eles. Essas perdas de massa não foram significativas entre os grupos.

6.2.3 AVALIAÇÃO DA PARASITEMIA

Outro parâmetro que nos auxiliou a confirmar o estabelecimento e caracterizar o desenvolvimento do quadro de malária, foi a avaliação dos níveis de parasitemia dos grupos *PbA*+ *A.a* 10 mg/Kg; *PbA*+ *A.a* 20 mg/Kg e *PbA*, que foi realizada nos dias 3º, 5º, 7º, 9º, 11º pós infecção. Houve um aumento da parasitemia gradativamente de acordo com a progressão da infecção em todos grupos infectados continuaram até o 11º dia de infecção por *PbA* conforme a evolução da doença (Figura 9).

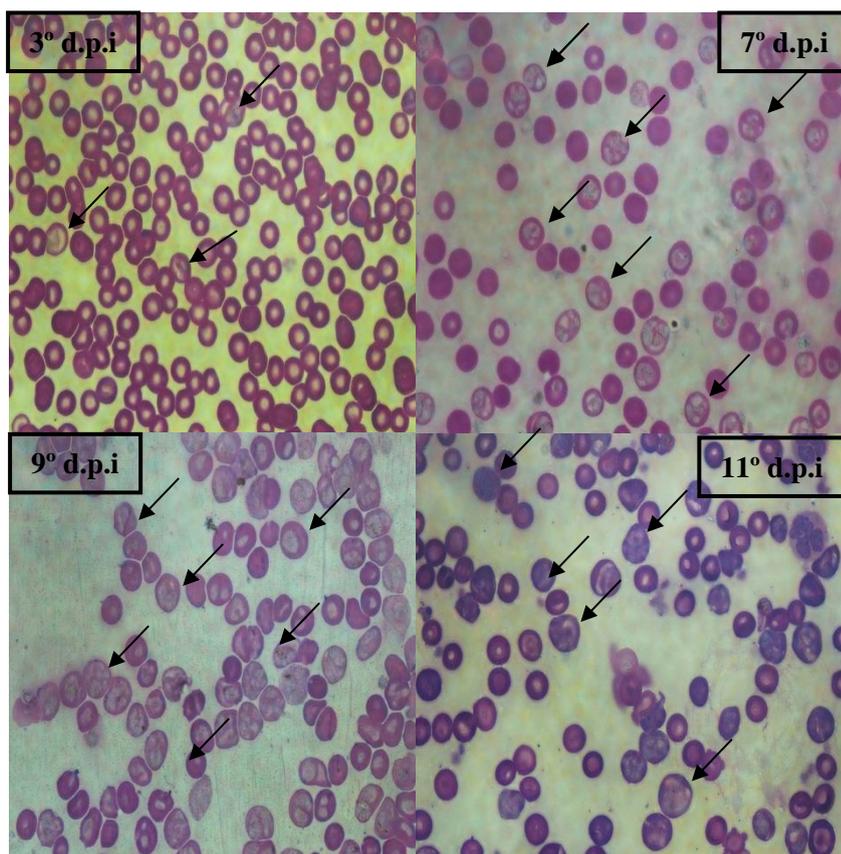


Figura 9: Fotomicrografias de distensões sanguíneas de camundongos C57BL/6 coradas pelo método de Giemsa (1000x) dos grupos infectados no 3º, 7º, 9º e 11º d.p.i. As setas marcam a presença dos diferentes estágios eritrocíticos do protozoário.

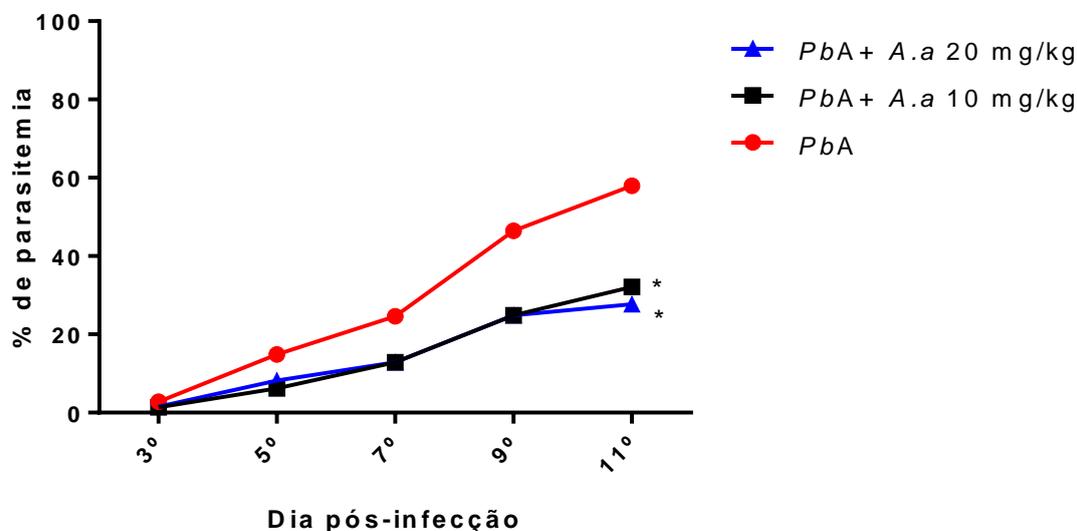


Gráfico 3: Acompanhamento da porcentagem de células infectadas dos camundongos C57BL/6 dos grupos: *PbA*+ Extrato de *A.a* 10 mg/Kg; *PbA*+ Extrato de *A.a* 20 mg/Kg e *PbA*, inoculados com *P. berghei* ANKA (*PbA*) por injeção intraperitoneal de 10^6 de eritrócitos parasitados e tratados por 8 dias (pré-tratamento/tratamento de 4 dias) com *A.a* 10 mg/Kg e 20mg/Kg ou PBS, acompanhados até o 11º pós-infecção (n=7;4;14). *PbA* vs *PbA* + *A.a* 20mg/kg $p=0.0478$ ($p<0.05$)

Nossos resultados mostram uma diminuição significativa do percentual de parasitemia do grupo *PbA* + *A.a* 20 mg/kg, comparados com o grupo *PbA*, observamos que no 11º dia pós-infecção essa redução da parasitemia foi de 32,12 % comparados com o grupo *PbA*, e que o grupo *PbA* +10mg/Kg houve uma diminuição significativa de 27.70% comparado ao grupo *PbA*, enquanto que no grupo *PbA* observamos um aumento da parasitemia de 46,45% de células parasitadas no 9º dia pós-infecção, (quando os animais começaram a evoluir a óbito), chegando a atingir 57,96% de parasitemia no 11º dia quando último animal veio a óbito. Podemos observar essa diminuição da parasitemia dos grupos tratados com *Aa* de forma qualitativa como mostra a figura 10, de acordo com a progressão da infecção a quantidade de eritrócitos parasitados é significativamente menor que o grupo *PbA*.

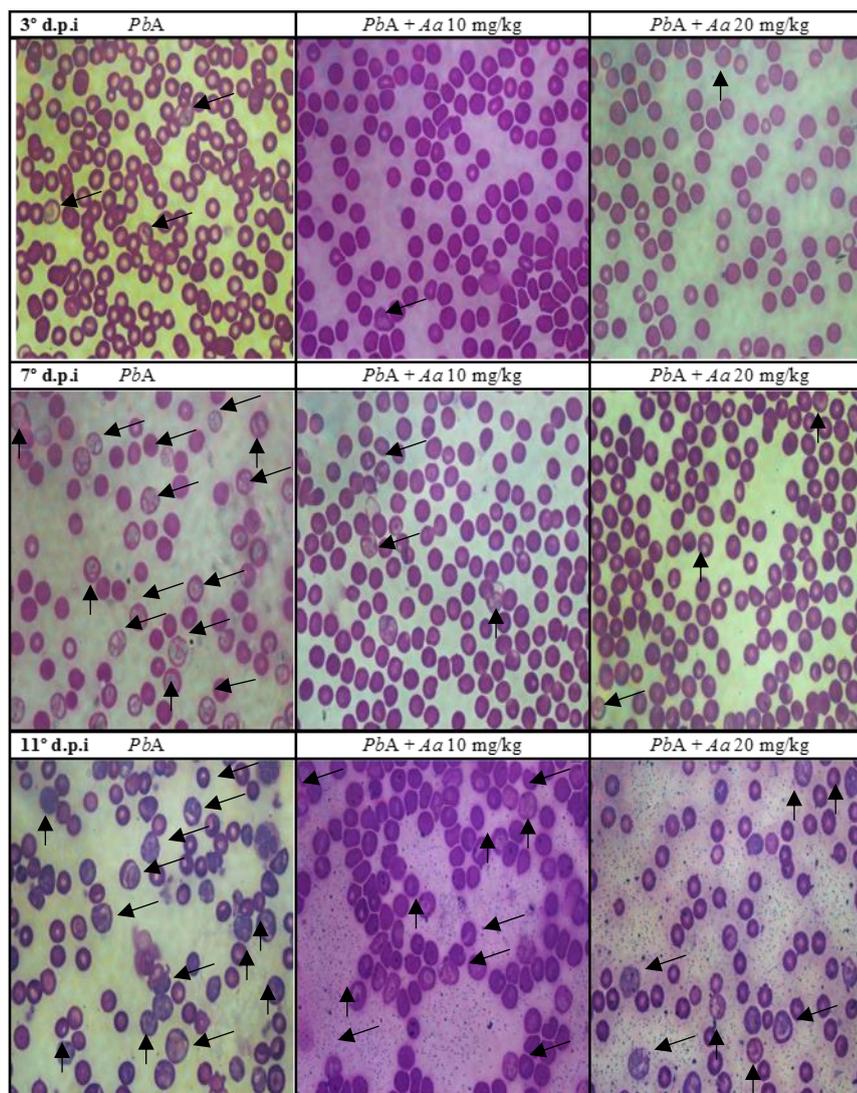


Figura 10: Avaliação qualitativa de Fotomicrografias de distensões sanguíneas de camundongos C57BL/6 coradas pelo método de Giemsa (1000x) dos grupos infectados no 3°, 7° e 11° d.p.i. As setas marcam a presença dos diferentes estágios eritrocíticos do protozoário de acordo com a progressão da infecção.

6.3 PESO DO FÍGADO

Com o intuito de demonstrarmos alterações que o fígado sofre na fase aguda da doença, apresentando-se progressivamente aumentado e pigmentado, realizamos a

hepatotectomia (Experimento B – tabela 3) dos animais controle e infectados. Os grupos foram acompanhados diariamente, monitorando os parâmetros de sobrevivência, massa corpórea e parasitemia no 3º, 5º, 7º e 9º pós-infecção e, no 10º pós-infecção, foi realizada a coleta do fígado para uma verificar se existiam diferenças entre os grupos na massa do fígado de camundongos C57BL/6. Em uma análise qualitativa, a hepatotectomia do fígado, deixou evidente a hepatomegalia nos grupos infectados (Figura 11) confirmando a alta atividade do parasita nesse órgão.

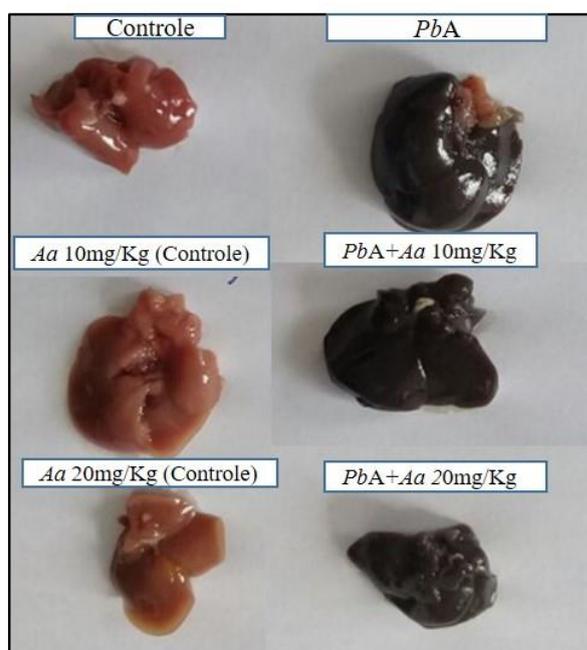


Figura 11: Análise qualitativa do Fígado dos camundongos C57BL/6 dos grupos controle: PBS; *A.a* 10 mg/Kg; *A.a* 20 mg/Kg e dos grupos inoculados com *P. berghei* ANKA (PbA) por injeção intraperitoneal de 10^6 de eritrócitos parasitados e tratados por 8 dias (pré-tratamento/tratamento de 4 dias) *PbA*+ *A.a* 10 mg/Kg; *PbA*+ *A.a* 20 mg/Kg e *PbA* no 10º pós-infecção

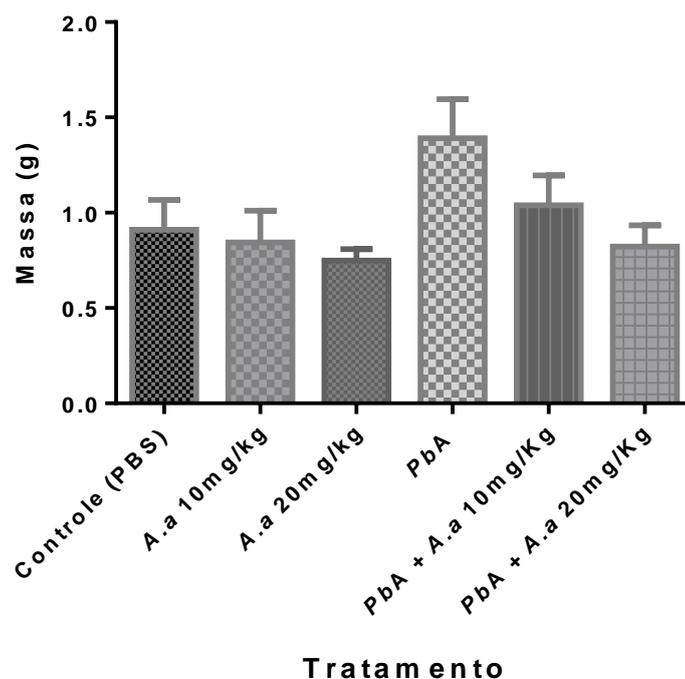


Gráfico 4: Peso do Fígado dos camundongos C57BL/6 dos grupos controle: PBS; *A.a* 10 mg/Kg; *A.a* 20 mg/Kg e dos grupos inoculados com *P. berghei* ANKA (PbA) por injeção intraperitoneal de 10^6 de eritrócitos parasitados e tratados por 8 dias (pré-tratamento/tratamento de 4 dias) *PbA*+ *A.a* 10 mg/Kg; *PbA*+ *A.a* 20 mg/Kg e *PbA* no 10° pós-infecção (n=7;4;14). Teste ANOVA, dados representados por média + EPM.

Através da pesagem do fígado no 10° dia pós infecção, demonstramos que o tratamento com o *Aa* nas doses de 10mg/Kg e 20mg/Kg influenciaram na diminuição desses valores quando comparados ao grupo *PbA* (Gráfico 5), embora não haja diferença significativa entre os grupos infectados, é evidente a proteção parcial de *Aa* principalmente na dose de 20mg/Kg.

7. DISCUSSÃO

As populações humanas convivem com uma grande diversidade de espécies vegetais, desenvolvendo maneiras particulares de explorá-las para distintas finalidades, usando-as como alternativa de sobrevivência. Dentre estas, do repertório cultural, destaca-se o conhecimento sobre a utilização de plantas para fins terapêuticos. Atualmente, as diversas pesquisas nas áreas de etnobotânica e etnomedicina representam importantes ferramentas de registro e documentação dos usos empíricos de plantas medicinais em comunidades tradicionais, gerando conhecimento útil ao desenvolvimento de novos medicamentos, à conservação da biodiversidade, a valorização do saber e da cultura local. Sabemos, que o uso de determinadas plantas medicinais é um processo de produção e reprodução de múltiplos saberes e práticas, originados de múltiplas formas culturais, e que resultam da organização social e produtiva de comunidades tradicionais.

Além da valorização do conhecimento tradicional dessas comunidades, essas pesquisas também proporcionam o surgimento de um interesse renovado nos possíveis benefícios econômicos oriundos de plantas, o qual transforma o próprio conhecimento em um tipo de produto valorizado economicamente e alvo da Bioprospecção.

Nesse sentido, o estudo etnomedicinal realizado nas comunidades quilombolas do presente projeto, além de valorizar o conhecimento tradicional local, pôde contribuir de forma positiva para o desenvolvimento de pesquisas científicas relacionadas ao uso de plantas medicinais. Na comunidade Araçá de Fora, dentre os sintomas mais citados para utilização de tratamento medicinal alternativo estão relacionados à dor ou inflamação (tabela 4), e a *A. amazonicus* apresenta-se como planta de uso medicinal citada pelos moradores dessa comunidade quilombola. Similar situação ocorre na comunidade Tapagem (tabela 5), dentre as indicações mais frequentes como, inflamação, anemia e alterações espirituais a *A. amazonicus* também é utilizada como planta de uso medicinal citada pelos moradores da comunidade quilombola. Através desse estudo por meio de visitas às comunidades conseguimos mostrar não só o uso de plantas medicinais nas duas comunidades quilombolas do Município de Oriximiná/PA: 1. Araçá de Fora (Rio Erepecurú); 2. Tapagem (Rio Trombetas), identificando os vegetais utilizados, a indicação do tratamento e as formas de preparo, como também demonstramos que o uso da *A. amazonicus* está presente em ambas as comunidades quilombolas visitadas e foi citada como planta utilizada para fins medicinais e no tratamento da malária. O

conhecimento sobre aspectos etnomedicinais e etnobotânico, utilizados em uma dada localidade, além de poder contribuir em âmbito global, com indícios de propriedades farmacológicas desses vegetais, já experimentados em nossa região, através da medicina popular, também, nos proporciona a oportunidade de valorização e registro de informações e receitas praticadas e preservadas de ao longo de gerações, sobre o uso de plantas como alternativa medicinal nas comunidades quilombolas.

Estudos etnofarmacológico mostram que a espécie *Ampelozizyphus amazonicus* é utilizada por comunidades quilombolas, no Brasil, para fins medicinais como: antimalárico, anemia, depurativo do sangue, diabetes, tônico para os nervos, combate a fadiga, memória, afrodisíaco, falta de apetite, doenças do fígado, dores estomacais, purgativo, inflamação de próstata, rins, indisposição, intoxicação, picada de cobra, contra aftas, erupções cutâneas, vírus da herpes simples, reumatismo, prisão de ventre (BRANDÃO et al., 1992; OLIVEIRA et al., 2011; RODRIGUES; ALMEIDA; PIRES, 2010). OLIVEIRA et al 2011, mostra a importância da *A. amazonicus* para as comunidades quilombolas do município de Oriximiná na prevenção da malária e na promoção da saúde, nas comunidades quilombolas de Oriximiná.

A medicina popular preconiza que, para haver a ingestão do chá de *Ampelozizyphus amazonicus*, é necessário limpar bem a parte a ser utilizada (raiz ou caule) e em seguida retirar a casca mais externa, para que se possa usar a entrecasca que está presente entre a casca e a madeira. Feito isso se deve raspar e colocar em um pouco de água e deixar temperar, batendo com um garfo ou próprio galho da planta até formar uma espuma, deixando descansar por 15 a 20 minutos para poder beber (ROCHA & SCARDA, 2003). A ingestão é feita principalmente antes de entrar na mata, antes de trabalhos pesados e para a prevenção e tratamento da malária (SANTOS et al., 2005).

Análises do extrato bruto da raiz e do caule de *Aa*, mostraram como principais compostos as saponinas triterpênicas, bem como outros compostos triterpênicos, como lupeol (que funciona com agente supressor de células cancerígenas), ácido betulínico, betulina, para os quais são apontadas 23 atividades, dentre as quais, como antimalárico, anti-helmíntico e anti-viral, ácido melaleico e ácido dihidroxilup20(29)-em-28βoico (DINIZ et al., 2009), tendo ainda apresentado lapachol, substância conhecida por sua propriedade anti-inflamatória, analgésica, antibiótica, antimalarial, antitripanossoma, antiulcerogênica, bactericida, fungicida, além de ser um reconhecido antitumoral e

anticarcinômico (ARAÚJO et al., 2002), mostrando uma possível atividade antitumoral da planta (SANTOS et al., 2005). MEYER et al. (2002).

A malária faz parte do grupo das doenças negligenciadas, que ocorrem geralmente entre as populações mais pobres nos trópicos e que têm pouca atenção por parte dos governos e das indústrias farmacêuticas (KRETLI, 2008). Anualmente três milhões de pessoas a contraem e cerca de um milhão morrem por causa dela. A região do mundo mais afetada é a África Subsariana e, no Brasil, a região amazônica é a mais afetada. As populações locais aprenderam a retirar do meio ambiente os recursos necessários para sobreviver e são atualmente a principal esperança na descoberta de novos medicamentos antimaláricos (TOMCHINSKY, 2013).

A MC humana é a manifestação mais grave e principal causa de óbitos em crianças menores de cinco anos e primíparas vivendo em área endêmica, formando os principais grupos de risco (MARSH et al., 1996). Esta síndrome apresenta uma patogênese complexa, sendo definida como uma encefalopatia difusa potencialmente reversível. O Sistema Nervoso Central (SNC) é considerado um sítio imunologicamente privilegiado, possuindo uma limitada reatividade imune e inflamatória em decorrência da presença da barreira hematoencefálica (BHE), composta por junções intercelulares especializadas. O curso desta síndrome não é obrigatoriamente letal, porém, os sobreviventes podem desenvolver danos neurológicos permanentes (MEDANA et al., 2002). Até o momento, não existe descrito literatura sobre os efeitos de *A. amazonicus* em modelos experimentais de MC.

Os estudos utilizando o modelo murino animal são importantes ferramentas no auxílio a erradicação da malária no mundo e buscam entender a complexa interação parasito-hospedeiro e as formas de contornar a gravidade gerada nas complicações da doença. Com esse entendimento, é possível chegar a produção de formas de combate ao parasito, seja por meio de desenvolvimento de fármacos eficazes no tratamento de indivíduos contaminados, seja no desenvolvimento de vacinas que podem, não somente gerar uma imunidade duradora, mas também interromper o ciclo biológico do parasito (TOMCHINSKY, 2013).

No parâmetro de sobrevivência, não houve diminuição da sobrevivência dos animais não infectados (grupo A.a 10 mg/kg, A.a 20mg/Kg e DMSO) com a cepa *PbA*, como já era esperado, enquanto que os camundongos C57BL/6 infectados com a cepa *PbA* apresentaram diminuição da sobrevivência no 9º dia após a infecção, corroborando

assim, com a literatura que descrevem alterações significativas na sobrevivência em camundongos susceptíveis ao quadro de MC, como é o caso da linhagem C57BL/6, que geralmente evoluem a óbito entre o 6º e 10º dia após a inoculação com os eritrócitos parasitados (DE SOUZA & RILEY, 2002; LACKNER et al., 2006). Os animais foram acompanhados até o 13º dia (quando o último animal veio a óbito) e os resultados mostram um aumento da sobrevivência e diminuição da parasitemia nos animais do grupo *PbA+* Extrato de *A.a* 10 mg/Kg e *PbA+* Extrato de *A.a* 20 mg/Kg, mostrando assim cientificamente, que a *A. amazonicus* melhora a sobrevivência de animais infectados com a cepa *PbA*, corroborando com a medicina tradicional sobre o uso da planta em humanos. Sugere-se mais estudos que confirmem os efeitos da *Aa* em modelo de MC, visto que os resultados, os mecanismos moleculares associados a tais efeitos se desenvolvem, estão poucos compreendidos.

A diminuição do consumo alimentar é uma condição fortemente associada a sintomas de infecções, sendo a causa principal da acentuada perda de peso e um indicativo da gravidade da doença (MATTHYS & BILLIAU, 1997). Para confirmar o estabelecimento do modelo de malária e caracterizar o desenvolvimento do quadro de malária, avaliou-se possível alteração no ganho de massa corpórea dos animais grupos: *PbA+* Extrato de *A.a* 10 mg/Kg; *PbA+* Extrato de *A.a* 20 mg/Kg, *PbA*, do grupo veículo (DMSO); extrato de *A.a* 10 mg/Kg e extrato de *A.a* 20 mg/Kg.

Nossos resultados mostram-se muito promissores em relação aos parâmetros avaliados, característicos da progressão da doença. Em relação às perdas de massa corpórea dos grupos experimentais, durante o pré tratamento, não observamos perdas significativas de massa entre os grupos, houve um aumento de massa corpórea de +- 3g até o último dia de tratamento em todos os grupos. No grupo dos animais infectados pelo plasmódio, seis dias após a inoculação já foram detectadas perdas de massa corpórea em relação ao grupo controle. Houve uma diminuição da massa corpórea gradativamente de acordo com a progressão da infecção, e essas perdas da massa corpórea em todos grupos infectados continuaram até o 12º dia de infecção por *PbA* conforme a evolução da doença, não havendo diferença significativa entre eles. Essas perdas de massa não foram significativas entre os grupos.

Além das manifestações clínicas, estudos demonstram o desenvolvimento da neuropatologia associada à malária, caracterizado por avaliações de parâmetros como

taxa de sobrevivência e evolução da parasitemia (BAGOT et al., 2002; MARTINS et al., 2009; LACERDA-QUEIROZ et al., 2010).

Investigar os mecanismos que levam ao desenvolvimento dos sintomas de MC nos humanos é complexo, pois o estudo em humanos impõe algumas barreiras éticas e sociais, sendo difícil a obtenção de resultados. Torna-se então importante a utilização de modelos animais experimentais e que estes sejam similares à MC humana de forma a entender os mecanismos que levam à patologia e ao desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. É fundamental ressaltar que o modelo murino de MC, como grande parte dos modelos, não é capaz de reproduzir todas as características observadas na MC humana, apresentando diferenças significativas que devem ser consideradas ao se extrapolar os resultados obtidos com esse modelo. No modelo murino, o leucócito é o tipo celular predominantemente sequestrado na microcirculação cerebral de camundongos, e não os eritrócitos, como na MC humana (LOU et al., 2001; DE SOUZA & RILEY, 2002; WHITE et al., 2010).

Pesquisas com a malária cerebral têm como objetivos entender o seu mecanismo e encontrar formas eficazes de tratamento, seja por meio da utilização de um fármaco ou por meio de uma vacina. É sabido que a infecção por *P. berghei* apresenta um aspecto característico, em que a parasitemia sanguínea tende a apresentar um aumento progressivo até se chegar a um platô (THURSTON, 1950).

A avaliação dos níveis de parasitemia dos grupos *PbA+ A.a* 10 mg/Kg; *PbA+ A.a* 20 mg/Kg e *PbA* foi realizada nos dias 3º, 5º, 7º, 9º, 11º pós infecção. Houve um aumento da parasitemia gradativamente de acordo com a progressão da infecção em todos grupos infectados continuaram até o 11º dia de infecção por *PbA* conforme a evolução da doença (Figura 9). Foram consideradas células parasitadas, todas as hemácias que mostravam formas variadas do parasita (formatos puntiformes na extremidade da hemácia, formatos de anel, trofozoíto e esquizontes), equivalentes as fases do desenvolvimento do *Plasmodium*.

Observou-se um aumento da parasitemia dos camundongos infectados por *P. berghei*, no 9º dia pós-infecção quando os animais começaram a evoluir a óbito, aumentando significativamente no 11º dia quando último animal veio a óbito.

Diante de um grande problema de saúde pública relacionado ao aumento progressivo da resistência dos parasitas aos antimaláricos disponíveis, principalmente no que se refere à artemisinina e seus derivados, torna-se necessário o desenvolvimento de

novas alternativas de controle da doença. Uma opção viável neste sentido é o desenvolvimento de novos medicamentos antimaláricos a partir de produtos naturais. Dados históricos revelam que as plantas são fontes importantes de agentes químicos ativos contra a malária. Tanto a quinina quanto os derivados da artemisinina são exemplos desse fato (RAMAZANI, 2010)

Nossos resultados mostram um aumento de 46,45% grupo *PbA* no 9º dia pós-infecção da parasitemia dos camundongos infectados por *P. berghei*, quando os animais começaram a evoluir a óbito, chegando a alcançarem 57,96% de parasitemia no 11º dia quando último animal veio a óbito, esse aumento foi superior aos grupos *PbA+ A.a* 10 mg/Kg e *PbA+ A.a* 20 mg/Kg que apresentaram 32,12% e 27,70% respectivamente. Compostos que reduzem a parasitemia em 30% ou mais são considerados ativos (CARVALHO, 1991). O extrato de *Aa* não diminuiu a parasitemia, mais impediu que ela aumentasse na mesma proporção que o grupo *PbA*. É possível que uma pré-tratamento mais prolongado sem um tratamento, ou outra via de administração cause uma redução maior da parasitemia, bem como um aumento da sobrevivência dos animais testados, já que esse extrato melhorou o parâmetro de parasitemia característicos da progressão da infecção, confirmando as indicações sugeridas na medicina tradicional relatado pelos moradores das comunidades quilombolas visitadas.

O tratamento com PBS do grupo dos camundongos infectados por *P. berghei* não aumentou a massa corpórea, não causou uma redução da parasitemia e nem reduziu a mortalidade dos animais.

A malária é uma infecção de comprometimento sistêmico, podendo interferir na atividade de vários órgãos, entre os quais o fígado e o baço destaca-se por ser intensamente afetado desde o início da infecção (TUJETA,2007).

O fígado possui um papel central no ciclo do parasita, uma vez que ainda sob forma de esporozoíto, o parasita penetra no fígado, por um mecanismo não muito esclarecido, se reproduzindo e provocando a ruptura do hepatócito, que viabiliza a penetração do parasita nas células do sangue (TUJETA,2007). O fígado na fase aguda apresenta-se progressivamente aumentado e pigmentado. Com o avanço da doença, parasitos e hemácias fagocitadas são vistos no interior dos macrófagos e os hepatócitos apresentam alterações nucleares e infiltração gordurosa (REY, 1992; COTRAN, 2000)

Nesse sentido, alterações no tamanho e formato do fígado são frequentes na malária e são um sinal clínico da doença, tendo em vista que ocorre a dilatação dos

quadrantes superiores do abdômem. Alkadarou et al.,2013 demonstrou alterações de tamanho do fígado e do baço em pacientes positivos para o *P. falciparum*, correlacionando esse aumento dos órgãos à atividade imunológica dos mesmos.

Para a realização da hepatectomia (Experimento B – tabela 3), os grupos foram acompanhados diariamente, monitorando os parâmetros de sobrevivência, massa corpórea e parasitemia no 3º, 5º, 7º e 9º pós-infecção e, no 10º pós-infecção, foi realizada a coleta do fígado para uma verificar se existiam diferenças entre os grupos na massa do fígado de camundongos C57BL/6. Em uma análise qualitativa, a hepatectomia do fígado, deixou evidente a hepatomegalia nos grupos infectados (Tabela 3) confirmando a alta atividade do parasita nesse órgão.

Através da pesagem do fígado demonstra que o tratamento com o extrato AE de A.a nas doses de 10mg/Kg e 20mg/Kg influenciaram na diminuição desses valores quando comparados com o grupo *PbA* (Figura 10), entretanto não houve diferença significativa no peso do fígado entre os grupos infectados, o que é justificado pela intensa exposição do fígado (primeiro e o principal órgão afetado durante a infecção) à atividade do *Plasmodium*.

8. CONCLUSÃO

1. O uso de *A. amazonicus* como planta de uso medicinal está presente, sendo indicada no tratamento e prevenção da malária, em ambas as comunidades quilombolas visitadas (Tapagem e Araçá de Fora) do município de Oriximiná-PA;
2. O tratamento com *Aa* nas doses 10mg/Kg e 20 mg/Kg aumentou a sobrevivência dos animais infectados com a cepa ANKA de *PbA*;
3. Houve diminuição da parasitemia dos camundongos C57BL/6 submetidos ao pré-tratamento/tratamento com *A.a* na dose de 20 mg/kg, com uma diferença de 30 % comparados com o grupo *PbA*;
4. Animais infectados apresentaram perdas gradativas de massa corpórea de acordo com a progressão da infecção;
5. A análise qualitativa e quantificação do peso do fígado, demonstrou uma proteção parcial nos animais do grupo *PbA* + *Aa* nas doses de 10 e 20mg/kg quando comparados com o grupo *PbA*

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALBUQUERQUE, U.P. Introdução a etnobotânica. Recife: Bagaço, 2002.87p.
2. ALFARO, M. AM. Estado actual de las investigaciones etnobotánicas en México. Boletín de la Sociedad Botánica, México, v.55, p. 65-74, 1994.
3. ALMEIDA, E.R. 1993. Brazilian medicinal plants. Popular and scientific knowledge. Editora Helmus, São Paulo, Brasil. 341 pp.
4. ALTMANN, K.H. Microtubule-stabilizing agents: a growing class of important anticancer drugs. Curr Opin Chem Biol, v.5, p. 424-431, 2001
5. AVARES, J. FORMAGLIO, P. THIBERGE, S. MORDELET, E. ROOIJEN, N. V. MEDVINSKY, A, MÉNARD, R. AMINO, R. Role of host cell crossing the sporozoite malaria during liver infection. Journal Experimental Medicine.210 (5): 905-915.2013.
6. ANDRADE-NETO, V.F.; BRANDÃO, M.G.L.; NOGUEIRA, F.; ROSÁRIO, V.E.; KRETTLI, A.U. 2008. *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke (Rhamnaceae), a medicinal plant used to prevent malaria in the Amazon Region, hampers the development of *Plasmodium berghei* sporozoites. International Journal for Parasitology, 38: 1505-1511.
7. BAPTISTA, F. G. G. Patogenicidade das células T CD8+ em modelos experimentais de malária cerebral, p. 55-65, 2007. Dissertação de Mestrado em Biologia Humana e Ambiente. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.
8. BAZIR, R. FAZALUL R. S. S. HASBALLAH, K. CHONG, W.C. TALIB, H. YAM, M.F. JABBARZARE, M. TIE, T.H. OTHMAN, F. MOKLAS, M.F. ABDULLAH, W.O. AHMAD, Z. *Plasmodium berghei* ANKA Infection in ICR Mice as a Model of Cerebral Malaria. Iranian Journal of Parasitology. 2012; 7(4): 62–74.
9. BBA Clinical. 2016 Jun; 5: 101–107.
10. BERENDT, A.R.; TURNER, G.D.H.; NEWBOLD, C.I. Cerebral malaria: The sequestration hypothesis. Parasitology Today, 10: 412-414, 1994
11. BERG, M.E. 1993. Medicinal plants in the Amazon: contribution to its systematic use. 2 Ed. Rev. Museu paraense Emílio Goeldi, Belém, Pará. 207 pp. (in Portuguese).
12. BERNARDO TOMCHINSKY. 2013. Etnobotânica de plantas antimaláricas em Barcelos, Amazonas. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônomicas. Botucatu : [s.n.], 2013 xiv, 189 f.

13. BONDI, F.S. The incidence and outcome of neurological abnormalities in childhood cerebral malaria: a long-term follow-up of 62 survivors. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 86(1): 17-9, 1992.
14. BRANDÃO, M.G.L.; BOTELHO, M.G.A.; KRETTLI, A.U. 1985. Experimental antimalarial chemotherapy with natural products: A more rational approach? *Ciência e Cultura*, 37: 1152-1163. (in Portuguese).
15. BRANDÃO, M.G.L.; LACAILE-DUBOIS, M.A.; TEIXEIRA, M.A.; WAGNER, H. 1992. Triterpene saponins from the roots of *Ampelozizyphus amazonicus*. *Phytochemistry*, 31: 352-354.
16. BRANDÃO, M.G.L.; LACAILE-DUBOIS, M.A.; TEIXEIRA, M.A.; WAGNER, H. 1993. A Dammarane-type saponin from the roots of *Ampelozizyphus amazonicus*. *Phytochemistry*, 34: 1123-1127.
17. BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de diagnóstico laboratorial da malária / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – Brasília : Ministério da Saúde, 2005. 112 p. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos)
18. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Vigilância em saúde : ações inovadoras e resultados : Gestão 2011-2014 / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – Brasília: Ministério da Saúde, 2015
19. CARVALHO, L.J.M.C.; MOREIRA, A.S.; DANIEL-RIBEIRO, C.T.; MARTINS, Y.C. Vascular dysfunction as a target for adjuvant therapy in cerebral malaria. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, Vol. 109(5): 577-588, 2014
20. CASTEEL, D.A. Antimalarial Agents. In: WOLFF, M.E. *Burger's Medicinal Chemistry and drug discovery*. 5 ed. Willey-Interscience Publication. v. 5, p. 4-90, 1997
21. CERIOTTI, F. HENNY, J. QUERALTÓ, J. ZIYU, S. OZARDA. Y. CHEN. B. BOYD, J. C. PANTEGHINI. M. Common reference intervals for aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and γ -glutamyl transferase (GGT) in serum: results from an IFCC multicenter study. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 48,1593–1601. 2010
22. . CLARK, I. A.; ROCKETT, K. A. The cytokine theory of human cerebral malaria. *Parasitol Today*, 1994. 10(10): 410-412
23. COMBES V, DE SOUZA J. B, RÉNIA L, HUNT N. H, GRAU G.E. Cerebral malaria: Which parasite? Which model? *Inflammation and Infectious Disease*. 2005; 2: 141-147
24. COMBES, V.; DE SOUZA, J.B.; RÉNIA, L.; HUNT, N.H.; GRAU, G.E. Cerebral malaria: which parasite? Which model? *Inflammation and Infectious Diseases*, 2(2): 141-147, 2005

25. CORONADO, L.M. NADOVICH, C.T.N. SPADAFORA, C. Malarial Hemozoin: From target to tool. *Biochimica Biophysica Acta*. June 1840(6): 2032–2041. 2014
26. COTRAN, R.S., KUMAR, V., COLLINS, T. Robbins. *Patologia estrutural e funcional*. Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan. Pp 350. 2000
27. COTTON, C. M. *Ethnobotany - principles and applications*. London, UK: Wiley, 1996. 424p.
28. D. R. OLIVEIRA, A. A. L. M. COSTA, G. G. LEITÃO, N. G. CASTRO, J. P. SANTOS, AND S. G. LEITÃO, “Estudo etnofarmacognóstico da saracuramirá (*Ampelozizyphus amazonicus* Ducke), uma planta medicinal usada por comunidades quilombolas do Município de Oriximiná-PA, Brasil,” *Acta Amazonica*, vol. 41, pp. 383–392, 2011
29. DANESHVAR, C.; DAVIS, T.M.; COX-SINGH, J.; RAFA'EE, M.Z.; ZAKARIA S.K.; DIVIS, P.C.; SINGH, B. Clinical and laboratory features of human *Plasmodium knowlesi* infection. *Clin Infect Dis*. v.15, n.49(6), p.852-60. 2009
30. DE SOUZA JB, RILEY EM. Cerebral malaria: the contribution of studies in animal models to our understanding of immunopathogenesis. *Microbes Infect*. 2002; 4: 291– 300
31. DEHARO, E.; GINSBURG, H. Analyses of additivity and synergism in the antiplasmodial effect of purified compounds from plant extracts. *Malaria Journal*. London, UK, v. 10 (Suppl 1.)2011
32. DESRUISSEAU MS, GULINELLO M, SMITH DN, LEE SC, TSUJI M, WEISS LM, SPRAY DC, TANOWITZ HB. Cognitive Dysfunction in Mice Infected with *Plasmodium berghei* Strain ANKA. *J Infect Dis*. 2008; 197: 1-7.
33. DINIZ, L.R.L., et al. Effect of triterpene saponins from roots of *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke on diuresis in rats. *Journal of Ethnopharmacology*. V. 123, p. 275–279, 2009
34. DINIZ, L.R.L.; SANTANA, P.C.; RIBEIRO, A.P.A.F.; PORTELLA, V.G.; PACHECO, L.F.; MEYER, N.B.; CÉSAR, I.C.; COSENZA, G.P.; BRANDÃO, M.G.L.; VIEIRA, M.A,R. 2009. Effect of triterpene saponins from roots of *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke on diuresis in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 123: 275-279
35. DOOLAN D.L., DOBANO C., BAIRD J.K. Acquired immunity to malaria. *Clin Microbiol Rev*. Vol 22(1). Pp 13-36. 2009
36. DUCKE, J.A.; MARTINEZ, R.V. 1994. *Amazonian Ethnobotanical Dictionary*. CRC Press, Boca Raton, USA. 215 pp.

37. ELISABETSKY, E. Etnofarmacologia como ferramenta na busca de substância ativa. In: SIMÕES, C. M. O (Org.) Farmacognosia: da planta ao medicamento. 2. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora Universidade Federal do Rio Grande do Sul/ Ed. da UFSC, 2000. p 87-99
38. FARNSWORTH, N. R.; AKERELE, O.; BINGEL, A. S.; SOEJARTO, D. D.; GUO, Z. Medicinal plants in therapy. Bull World Health Organ, v. 63, n. 6, p. 965-981, 1985
39. GARCIA, L. S. Malaria. Clinics in Laboratory Medicine, 30 .93–129.2010
40. GESSLER, M. C.; NKUNYA, M. H. H.; MWASUMBI, L. B.; HEINRICH, M.; TANNER, M. Screening Tanzanian medicinal plants for antimalaria activity. Acta Tropica, v.56, p.65-77. 1994
41. GRAU, G.E, PIGUET, P.F, ENGERS, H.D, LOUIS, J. A, VASSALI, P, LAMBERT, P.H. L3T4+ T lymphocytes play a major role in the pathogenesis of murine cerebral malaria. J Immunol. 1986; 137: 2348-2354
42. GRAZ, B.; KITUA, A. Y.; MALEDO, H. M. To what extent can traditional medicine contribute a complementary or alternative solution to malária control programmes. Malaria Journal, London, UK, 10 (Suppl 1). 2011
43. HUNT N.H., GOLENSER J., CHAN-LING T., PAREKH S., RAE C., POTTER S., MEDANA I.M., MIU J., BALL H.J. Immunopathogenesis of cerebral malaria. International Journal for Parasitology. Vol 36. Pp 569-582. 2006
44. HUNT NH, GRAU GE. Cytokines: accelerators and brakes in the pathogenesis of cerebral malaria. Trends Immunol. 2003; 24: 491-499
45. HUNT, N.H. & GRAU, G.E. Cytokines: accelerators and brakes in the pathogenesis of cerebral malaria. TRENDS in Immunology, 24(9): 491-499, 2003
46. IDRO, R; JENKINS, N.E.; NEWTON, C.R. Pathogenesisclinical features, and neurological outcome of cerebral malaria. Lancet Neurology, 4 (12):827-40, 2005
47. KRETTLI, A.U.; ANDRADE-NETO, V.F. 2004. Search antimalarial drugs in the folk medicine. *Ciência Hoje*, 35: 70-73 (in Portuguese).
48. KRETTLI, A.U.; ANDRADE-NETO, V.F.; BRANDÃO, M.G.L.; FERRARI, W.M.S. 2001. The Search for new antimalarial drugs from plants used to treat fever and malaria or plants randomly selected: a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 96: 1033-1042.
49. KRETTLI, A.U.; ANDRADE-NETO, V.F.; BRANDÃO, M.G.L.; FERRARI, W.M.S. The Search for New Antimalarial Drugs from Plants Used to Treat Fever

- and Malaria or Plants Randomly Selected: a Review. Memorial Instituto Oswaldo Cruz. Vol. 96 (8), p.1033-1042, 2001.
50. LACERDA-QUEIROZ N, RODRIGUES DH, VILELA MC, MIRANDA AS, AMARAL DC, CAMARGOS ER, CARVALHO LJ, HOWE CL, TEIXEIRA MM, TEIXEIRA AL. Inflammatory changes in the central nervous system are associated with behavioral impairment in *Plasmodium berghei* (strain ANKA)-infected mice. *Exp Parasitol.* 2010; 125: 271-278
 51. LACKNER P, BEER R, HEUSSLER V, GOEBEL G, RUDZKI D, HELBOK R, TANNICH E, SCHMUTZHARD E. Behavioural and histopathological alterations in mice with cerebral malaria. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2006; 32: 177-188
 52. LAMB T. J., BROWN D.E., POTOENIK A.J., LANGHORNE, J. Insights into the immunopathogenesis of malaria using mouse models. Expert review in molecular medicine. Vol 24 (8). 2006
 53. LANGHORNE J. Immunology and immunopathogenesis of malaria. London: Springer. Pp 109-113. 2005
 54. LIMA, R.B. 2006. Flora of the Ducke Reserve, Amazonas, Brazil: Rhamnaceae. *Rodriguésia*, 57: 247-249 (in Portuguese).
 55. LONGLEY, R.J. HILL, A.V.S. SPENCER, A.J. Malaria vaccines: identifying *Plasmodium falciparum* liver-stage targets. *Frontiers in Microbiology.* 6: 965. 2015
 56. LOU J, LUCAS R, GRAU GE. Pathogenesis of Cerebral Malaria: recent experimental data and possible applications for humans. *Clin Microbiol Rev.* 2001; 14: 810-820
 57. LOU, J.; GASCHÉ, Y.; ZHENG, L.; CRÍTICO, B.; MONSO-HINARD, C.; JUILLARD, P.; MOREL, P.; BUURMAN, W.A.; GRAU, G.E. Differential reactivity of brain microvascular endothelial cells to TNF reflects the genetic susceptibility to cerebral malaria. *European Journal of Immunology*, 28(12): 3989-4000, 2001.
 58. M. S., 170 CUNHA, E. V. L. Plants of the American continent with antimalarial activity. *Braz J. Pharmacology*, São Paulo, SP, v. 61, p. 1401-1433. 2009.
 59. MARIATH, I. R.; FLACÃO, H. S.; BARBOSA-FILHO J. M., SOUSA, L. C. F.; TOMAZ, A. C.; DINIZ, M. F.; ATHAYDE-FILHO, P. F.; TAVARES, J. F.; SILVA, 2009
 60. MARSH, K.; ENGLISH, M.; CRAWNLEY.; PESHU, N. The pathogenesis of severe malaria in African children. *Ann. Trop. Med. Parasitolol.* 090: 395-402, 1996

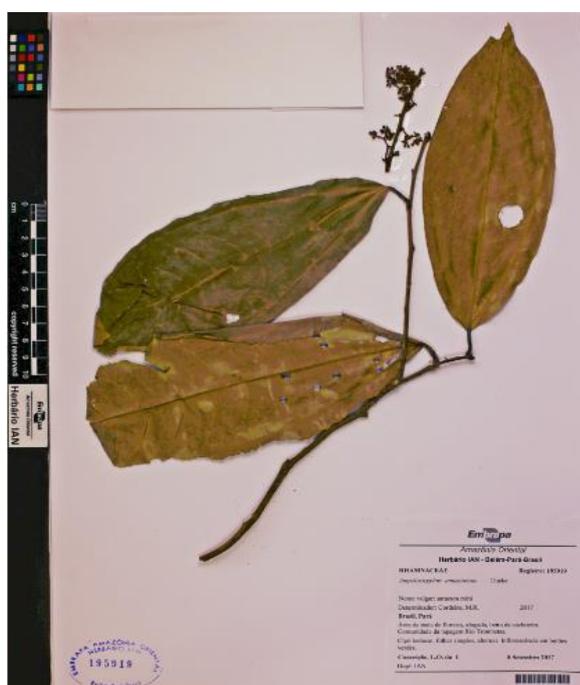
61. MARTINS Y.C., CARVALHO L.J.M., DANIEL-RIBEIRO C.T Challenges in the determination of early predictors of cerebral malaria: lessons from the human disease and the experimental murine models. *Neuroimmunomodulation*. Vol 16. Pp 134-145. 2009
62. MARTINS, Y.C.; CARVALHO, L.J.M.; DANIEL-RIBEIRO, C.T. Challenges in the determination of early predictors of cerebral malaria: lessons from the human disease and the experimental murine models. *Neuroimmunomodulation*, 16: 134-145,2009
63. MEB - Movimento de Educação de Base – Parintins-AM. *Popular medicine recipes*. Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas. 26 pp. (in Portuguese) 1993.
64. MEDANA, I.M.; TURNER, G.D. Human cerebral malaria and the blood-barrier. *International journal of parasitology*, 36 (5): 555-68, 2006
65. MILLER, L. H.; BARUCH, D.J.; MARSH, K.; DOUMBO, O.K. The pathogenesis basis of malaria. *Nature*, 415: 673-679, 2002
66. MINISTÉRIO DA SAÚDE, Copyright © 2015 Portal da Saúde – Ministério da Saúde – disponível em: www.saude.gov.br
67. MS. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Guia prático de tratamento da malária no Brasil. Secretaria de vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasília, DF. 2010
68. MUNG'ALA-ODERA V, SNOW RW, NEWTON CRJC. The burden of the neurocognitive impairment associated with Plasmodium Falciparum malaria in sub-saharan Africa. *Am J Trop Med Hyg.*; 71: 64–70, 2004
69. MURGATROYD, F. The chemotherapy of malaria. *Postgraduate medical journal*, v. 28: p. 5-10, 1952.
70. NEWMANN, D.J.L.; CRAGG,G.M. Natural products as source of new drugs over the last 25 years. *J. Nat. Pro*, Ohio, Columbus, v. 70, p. 461-477. 2007
71. OLIVEIRA, D.R. 2004. *Etnobotanical survey of medicinal plants used in the city of Oriximiná (Pará state) with ethnopharmacology focus to the Lippia genus*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 149 pp (in Portuguese).
72. REVILLA, J. 2002. *Useful plants of the Amazon basin*. Vol. 1. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia / SEBRAE-AM, Manaus, Amazonas. 858 pp. (in Portuguese).

73. REY, L., Malária: Os Plasmodios Humanos. Bases da Parasitologia Médica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; p. 106-114. 1992
74. ROCHA, S.F.R. & SCARDA, F.M. Plantas medicinais: Etnobotânica na Várzea do Mamirauá. Manaus: SEBRAE, 2003, 218p
75. RODRIGUES, E. 2006. Plants and animals utilized as medicines in the Jaú National Park (JNP), Brazilian Amazon. *Phytotherapy Research*, 20: 378-391
76. RODRIGUES, R.M. 1989. *The amazonian flora*. CEJUP, Belém, Pará, 462 pp (in Portuguese).
77. ROSAS, L.V.; CORDEIRO, M.S.C.; CAMPOS, F.R.; NASCIMENTO, S.K.R.; JANUÁRIO, FRANÇA, A.H.; NOMIZO, S.C.A.; TOLDO, M.P.A.; ALBUQUERQUE, S.; PEREIRA, P.S. In vitro evaluation of the cytotoxic and trypanocidal activities of *Ampelozizyphus amazonicus* (Rhamnaceae). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. V. 40, p. 663-670, 2007.
78. ROSAS, L.V.; CORDEIRO, M.S.C.; NASCIMENTO, S.K.R.; JANUÁRIO, A.H.; FRANÇA, S.C.; NOMIZO, A.; TOLDO, M.P.A.; ALBUQUERQUE, S.; PEREIRA, P.S. 2007. In vitro evaluation of the cytotoxic and trypanocidal activities of *Ampelozizyphus amazonicus* (Rhamnaceae). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 40: 663-670.
79. SADANAND, S. Malaria: an evaluation of the current state of research on pathogenesis and antimalarial drugs. *The Yale Journal of Biology Medicine*. 83. 185 – 191. 2010.
80. SANTOS, A.M.S.; KAHWAGE, C.C.; FERREIRA, M.R.C.; SAMPAIO, N.A. 2005. Traditional medicines in the Rio Negro Valley (Amazonas state, Brazil). Observations on the ethnopharmacology and the use of the plant saracuramirá (*Ampelozizyphus amazonicus*): Pharmacological activity and/or symbolic efficacy. *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi: Série Ciências Humanas*, 1: 137-147. (in Portuguese, with abstract in English).
81. SANTOS, F.S.D.; MUAZE, M.A.F. 2002. *Traditions in movement: An ethnohistory of the health and illness in the valleys of the Acre and Purus rivers*. Paralelo 15, Brasília, Distrito Federal. 170 pp. (in Portuguese).
82. SHOFIELD, L.; GRAU, G.E. Immunological processes in malaria pathogenesis. *Nature Reviews Immunology*. 5 (9): 722-35, 2005
83. SILVA, J.R.A.; CORREA, G.M.; CARVALHO, J.R.; COSTA, R.A.; PINHEIRO, M.L.B.; ARAUJO, L.M.; AMARAL, A.C.F. 2009. Analyses of *Ampelozizyphus amazonicus*, a plant used in folk medicine of the Amazon Region. *Pharmacognosy Magazine*, 4: 75-80.

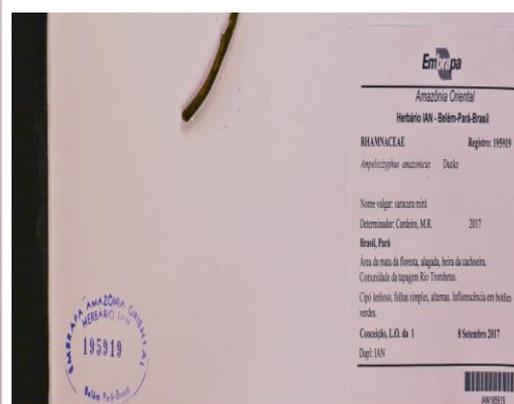
84. SILVA, S. M. P. Histórico, conhecimento tradicional e recursos vegetais medicinais do bairro rural do Benfica, Piquete – SP. Tese (Doutorado em Agronomia: Horticultura). Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu: 2003
85. SOOKOIAN S, PIROLA CJ. Alanina e aspartato aminotransferase e via de ciclagem de glutamina: seus papéis na patogênese da síndrome metabólica. *World J Gastroenterol*. 2012; 18 : 3775-3781.
86. TAVARES, J. FORMAGLIO, P. THIBERGE, S. MORDELET, E. ROOIJEN, N. V. MEDVINSKY, A, MÉNARD, R. AMINO, R. Role of host cell crossing the sporozoite malaria during liver infection. *Journal Experimental Medicine*. 210 (5): 905-915. 2013
87. TOLEDO, V. M. What is ethnoecology? Origins, scope and implications of a rising discipline. *Ethnoecológica*, v.1, n.1, p. 5-22. 1992.
88. VANDERBERG, J. P. FREVERT, U. Intravital microscopy demonstrating antibody-mediated immobilization of *Plasmodium berghei* sporozoites injected into skin by mosquitoes. *International Journal of Parasitology*. 34 991–996. 2004.
89. VAN DER HEYDE HC, NOLAN J, COMBES V, GRAMAGLIA I, GRAU GE. A unified hypothesis for the genesis of cerebral malaria: sequestration, inflammation and hemostasis leading to microcirculatory dysfunction. *Trends Parasitol*, 2006. 22(11): 503-508.
90. VIEIRA, L.S. 1992. *Amazonian phytotherapy*. Editora Agronômica Ceres, São Paulo, Brasil. 347 pp. (in Portuguese).
91. WHITE, N.J. *Plasmodium knowlesi*: the fifth human malaria parasite. *Clin Infect Dis*. v.15, n. 46, p.172-3. 2008.
92. WILLCOX, M. L.; BODEKER, G.; RASOANAIVO, P. (2004) *Traditional Medicinal Plants and Malária*. *Traditional Medicines for Modern Times*, CRC Press, London, UK. 2004.
93. WILLCOX, M; BODEKER, G. Frequency of use of traditional herbal medicines for the treatment and prevention of malaria: an overview of the literature. In.: *Traditional medicinal plants and malaria*. Org. Willcox, M.; Bodeker, G.; Rasoanaivo, P. CRC Press. 2004.
94. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *World Malaria Report*, 2014
95. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *World Malaria Report*, 2015
96. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *World Malaria Report*, 2016

APÊNDICE

1. Exsicata *A. amazonicus*



2. ficha com nº de registro e nº de coletor



3.Termo de Consentimento livre e esclarecido



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO UNIVERSITÁRIO DE OROXIMINÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Colegiado do Curso de Licenciatura
e Bacharelado em Ciências Biológicas:
Efases em Conservação de Águas Interiores

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título da Pesquisa: Levantamento etnobotânico de Plantas medicinais usadas na medicina popular em Comunidades Ribeirinhas do município de Oriximiná - PA

Pesquisador Principal: Leonia da Conceição de Oliveira

Pesquisadores assistentes: Cristiane Cristine de Sousa Pereira, Ana Carla Picanço Bentes

Orientadores: Siany Liberal e Domingos Diniz

O Sr (Sra.) está sendo convidada (o) a participar desta pesquisa que tem como finalidade o levantamento etnobotânico, sobre plantas medicinais para comunidades rurais e disponibilizar o conhecimento científico relacionado à biotividade de plantas usadas na medicina popular nas mesmas visando a troca de experiências relacionadas ao tema. A pesquisa está sendo realizada com um número de 20 a 50 ribeirinhos adultos por comunidades visitadas. Ao participar deste estudo o Sr. (Sra.) permitirá que a pesquisadora Leonia da Conceição de Oliveira desenvolva seu Projeto de Extensão que é complemento de seu projeto de conclusão de curso (TCC). O Sr (Sra.) tem liberdade de se recusar a participar e ainda se recusar a continuar participando em qualquer fase da pesquisa, sem qualquer prejuízo para o Sr (Sra.). Sempre que quiser poderá pedir mais informações sobre a pesquisa através do telefone da pesquisadora do projeto, dos orientadores e do Núcleo Universitário de Oriximiná, e se necessário através do telefone do Comitê de Ética em Pesquisa de Belém. A sua participação nesta pesquisa não traz consequências legais. Os procedimentos adotados nesta pesquisa obedecem aos Critérios da Ética em Pesquisa com Seres Humanos conforme Resolução no. 196/96 do Conselho Nacional de Saúde. Nenhum dos procedimentos usados oferece riscos à sua dignidade, e todas as informações coletadas neste estudo são estritamente confidenciais. Somente a pesquisadora e o orientador terão conhecimento dos dados. Ao participar desta pesquisa a Sr. (Sra.) não terá nenhum benefício direto. Entretanto, esperamos que este estudo traga informações importantes sobre conhecimento científico relacionado a plantas usadas na medicina popular, de forma que o conhecimento que será construído a partir desta pesquisa possa ser torná-los cidadãos mais participativos, onde pesquisador se compromete a divulgar os resultados obtidos. O Sr (Sra.) não terá nenhum tipo de despesa para participar desta pesquisa, bem como nada será pago por sua participação.

Após estes esclarecimentos, solicitamos o seu consentimento de forma livre para participar desta pesquisa. Portanto preencha, por favor, os itens que se seguem.
Obs: Não assine esse termo se ainda tiver dúvida a respeito.

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Tendo em vista os itens acima apresentados, eu, de forma livre e esclarecida, manifesto meu consentimento em participar da pesquisa. Declaro que recebi cópia deste termo de consentimento, e autorizo a realização da pesquisa e a divulgação dos dados obtidos neste estudo.

Nome do Participante da Pesquisa

Assinatura do Participante da Pesquisa

Assinatura do Pesquisador

Assinatura do Orientador

Assinatura do Orientador

Pesquisador Principal: LEONIA DA CONCEICAO DE OLIVEIRA
TELEFONE PARA CONTATO: (93) 3544-4163, E (93) 91865368

Demais pesquisadores: CRISTIANE CRISTINE DE SOUZA PEREIRA
TELEFONE PARA CONTATO: (93) 3544-1590 E (93) 91858807

ANA CARLA PICANCO BENTES
TELEFONE PARA CONTATO: (93) 91838798 E (93) 81187048

ORIENTADORES: SIANY LIBERAL: (93) 91452418

DOMINGOS DINIZ: (93) 91349788

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ: (93) 3544- 1385

ANEXO

Imagens das visitas às comunidades Araçá de Fora e Tapagem



