



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

**ARIMAR CHAGAS DE ALMEIDA**

ATIVIDADE ANTIMALÁRICA DA *Kalanchoe pinnata* SOBRE O *Plasmodium berghei*  
EM MODELO EXPERIMENTAL *IN VIVO*

Santarém - 2019

ARIMAR CHAGAS DE ALMEIDA

ATIVIDADE ANTIMALÁRICA DA *Kalanchoe pinnata* SOBRE O *Plasmodium berghei*  
EM MODELO EXPERIMENTAL *IN VIVO*

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências, junto ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Biociências.

**Orientador:** Prof. Dr. Waldiney Pires Moraes

Santarém – 2019

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

---

- A447a Almeida, Arimar Chagas de  
Atividade antimalárica da *Kalanchoe pinnata* sobre o *Plasmodium berghei*  
em um modelo experimental *in vivo* / Arimar Chagas de Almeida. – Santarém  
: UFOPA, 2019.  
83 f.: il.  
Inclui bibliografias.
- Orientador: Waldiney Pires Moraes  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Oeste do Pará, Pró-Reitora  
de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação Tecnológica, Programa de Pós-  
Graduação Biociências.
1. Malária. 2. *Plasmodium berghei*. 3. *Kalanchoe pinnata*. I. Moraes,  
Waldiney Pires, orient. II. Título.

CDD: 23 ed. 615.321

---

## RESUMO

A malária é uma doença infecciosa causada por um parasita microscópico, o qual infecta cerca de 200 milhões de pessoas por ano. Se apresenta como uma febre cíclica seguida de calafrios, sudorese intensa, náuseas, vômitos, palidez e fraqueza física, que se intensificam de acordo com o nível de parasitemia e as espécies de *Plasmodium* que infectam os indivíduos. Apesar de ser um problema mundial, a malária não apresenta uma distribuição geográfica homogênea, sendo sua maior incidência em regiões tropicais e subtropicais como por exemplo a Amazônia Legal no Brasil. Atualmente, uma gama de medicamentos usados no tratamento da malária tornou-se ineficiente porque algumas cepas de *Plasmodium vivax* e *Plasmodium falciparum* já apresentam resistência múltipla a essas drogas. Nesse contexto, é necessário buscar novas alternativas terapêuticas para o tratamento da malária, como as plantas. Dentre as milhares de espécies vegetais, a *Kalanchoe pinnata* é uma planta que apresenta indicativo de efeito hipotensivo, anti-inflamatório e anti-reumático. Assim, surgiu a possibilidade de pesquisas com o extrato de *Kalanchoe pinnata*, amplamente utilizado no norte do Brasil para o tratamento de inflamações, feridas, úlceras cutâneas, abscessos, analgesia e também atividade antiparasitária contra *Leishmania amazonensis*. Em vista disto, o presente estudo tem como objetivo avaliar a atividade antimalárica do extrato etanólico de *Kalanchoe pinnata* em modelo *in vivo* de malária utilizando camundongos BALB/c infectados com *Plasmodium berghei*. Para este fim, o extrato etanólico de *Kalanchoe pinnata* foi avaliado quanto a sua toxicidade e efeitos (supressão de densidade parasitária, tempo de sobrevida dos animais, níveis de glicose plasmática, função hepática e renal e parâmetros hematológicos) no tratamento de camundongos BALB/c infectados com *Plasmodium berghei*. Assim, o extrato de *K. pinnata* apresentou-se seguro para o tratamento nas doses estudadas, mostrando efeito semelhante ao fármaco padrão artemisina, como aumento do tempo de sobrevida, supressão parasitária, controle dos níveis glicêmicos e das funções renais e hepáticas, além dos parâmetros hematológicos. Dessa forma, conclui-se que tal extrato se apresenta como alternativa promissora para o tratamento da malária, devendo novos estudos serem realizados para determinação da estabilidade da formulação e avaliações clínicas e regulatórias, a fim de se alcançar a comercialização.

Palavras chave: *Plasmodium berghei*, *Kalanchoe pinnata*, malária.

## ABSTRACT

Malaria is an infectious disease caused by a microscopic parasite, which infects about 200 million people a year. It presents as a cyclic fever followed by chills, intense sweating, nausea, vomiting, pallor and physical weakness, which intensify according to the level of parasitemia and the species of *Plasmodium* that infect individuals. Despite being a worldwide problem, malaria does not present a homogeneous geographic distribution, being its higher incidence in tropical and subtropical regions such as the Legal Amazon in Brazil. Currently, a range of drugs used to treat malaria has become inefficient because some strains of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* already have developed multiple resistance to these drugs. In this context, it is necessary to search for new therapeutic alternatives for the treatment of malaria, such as plants. Among the thousands of plant species, *Kalanchoe pinnata* is a plant that presents indicative of hypotensive, anti-inflammatory and antirheumatic effect. Thus, the possibility of researches with the extract of *Kalanchoe pinnata*, widely used in the North of Brazil for the treatment of inflammations, wounds, cutaneous ulcers, abscesses, analgesia and also antiparasitic activity against *Leishmania amazonensis*. In view of this, the present study aims to evaluate the antimalarial activity of the hydroalcoholic extract of *Kalanchoe pinnata* in an *in vivo* model of malaria using BALB/c mice infected with *Plasmodium berghei*. To this end, the hydroalcoholic extract of *Kalanchoe pinnata* was evaluated for its toxicity and effects (suppression of parasite density, animals survival time, plasma glucose levels, liver and renal function and haematological parameters) in the treatment of BALB/c mice infected with *Plasmodium berghei*. Thus, *K. pinnata* extract was safe for treatment with the studied doses, showing similar effect of the standard drug artemisinin, such as increased survival time, parasitic suppression, control of glycemic levels and renal and hepatological functions, besides haematological parameters. Thus, it has been shown that this extract presents itself as an effective alternative for the treatment of malaria, and further studies should be performed to determine the stability of the formulation and clinical and regulatory evaluations in order to achieve commercialization.

Keywords: *Plasmodium berghei*, *Kalanchoe pinnata*, malaria.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Risco da malária, segundo o índice parasitário anual no Brasil, para os anos de 2012 e 2013..... 12
- Figura 2**- Ciclo de vida do *Plasmodium* ..... 16
- Figura 3**- Estruturas químicas das principais drogas antimaláricas .....27
- Figura 4**- Estrutura dos principais flavonoides presentes no extrato de *K. pinnata*. a) quercetina 3-O- $\alpha$ -L-arabinopiranosil (1 $\rightarrow$ 2)  $\alpha$ -L-ramnopiranosídeo, b) quercitrina, c) 4',5-di-hidroxi-3',8-dimetoxiflavona 7-O- $\beta$ -D-glucopiranosídeo e d) kapinatosídeo (kaempferol 3-O- $\alpha$ -L-arabinopiranosil (1 $\rightarrow$ 2)  $\alpha$ -L-ramnopiranosídeo) .....34
- Figura 5**- Estruturas químicas de alguns dos triterpenos e esteroides encontrados na *K. pinnata* .....35
- Figura 6**- Cromatograma do extrato etanólico com concentração 10 mg/mL obtida a partir das folhas de *K. pinnata*.....51
- Figura 7**- Cromatograma por corrida isocrática do extrato etanólico com concentração 10 mg/mL obtida a partir das folhas de *K. pinnata*.....52
- Figura 8**- Espectro de UV-Vis pertencente ao pico majoritário do extrato etanólico da *K. pinnata*.....53
- Figura 9**- Curva de calibração a partir de flavonoides totais expresso como rutina .....53
- Figura 10**- Variação da massa corporal dos grupos estudados no A) 4<sup>o</sup>, B) 7<sup>o</sup>, C) 9<sup>o</sup> e D) 11<sup>o</sup> dias. Cada barra representa a massa, expressa em gramas, dos animais após a inoculação do *Plasmodium berghei*, nos grupos experimentais G2 Malária, G3 Artemisinina, G4 *K. pinnata* 200 mg, G5 *K. pinnata* 100 mg e G6 *K. pinnata* 10 mg.56
- Figura 11**- Tempo de sobrevivência dos animais. Cada barra representa o tempo, expresso em dias, de sobrevivência dos animais após a inoculação do *P. berghei*, nos grupos experimentais G2 Malária, G3 Artemisinina, G4 *K. pinnata* 200 mg, G5 *K. pinnata* 100 mg e G6 *K. pinnata* 10 mg. \*\*\* Representa que houve uma diferença significativa ( $p < 0,001$ ) no tempo de vida dos animais dos grupos tratados com Artemisinina 100 mg, *K. pinnata* 200 mg, *K. pinnata* 100 mg e *K. pinnata* 10 mg quando comparados ao grupo Malária (ANOVA, seguido do teste Tukey). .....57
- Figura 12**- Evolução da parasitemia. Cada ponto representa a média  $\pm$  da densidade parasitária de animais pertencentes ao grupo G2 malária (infectados com *Plasmodium berghei*), G3 Mal + artemisinina (tratados com artemisinina 100 mg/kg/dia), G4-G6 Mal + K.P 10 mg, Mal + K.P 100 mg e Mal + K.P 200 mg (Tratamento com o extrato da *K. pinnata* 10, 100 e 200 mg/kg/dia respectivamente). N=10 números de animais por grupo. \*\*\* Representa a diferença ( $p < 0,05$ ) da densidade parasitária do grupo (Malária) em relação aos grupos (Mal + Artemisinina), (Mal + K.P 10 mg, Mal + K.P 100 mg e Mal + K.P 200 mg, respectivamente). .....58
- Figura 13**- Avaliação dos níveis séricos de glicose sanguínea. Cada barra representa média + Desvio padrão dos níveis de glicose em mg/dL dos animais analisados no 11<sup>o</sup> dia de tratamento após a inoculação do *P. berghei*, nos grupos experimentais G2 Malária, G3 Artemisinina, G4 *K. pinnata* 200 mg, G5 *K. pinnata* 100

mg e G6 *K. pinnata* 10 mg. \*\*\* Representa que houve uma diferença significativa ( $p < 0,001$ ) e \*\* diferença significativa ( $p < 0,01$ ) nos níveis de glicose dos animais dos grupos tratados com Artemisinina 100 mg, *K. pinnata* 200 mg, *K. pinnata* 100 mg e *K. pinnata* 10 mg quando comparados ao grupo Malária (ANOVA, seguido do teste Tukey). .....59

**Figura 14-** Concentração sanguínea das enzimas hepáticas Alanina aminotransferase (AST) e Aspartato Aminotransferase (ALT). Cada barra representa média + Desvio padrão dos níveis de AST em mg/dL e ALT em U/L dos animais analisados no 11<sup>o</sup> dia de tratamento após a inoculação do *P. berghei*, nos grupos experimentais G2 Malária, G3 Artemisinina, G4 *K. pinnata* 200 mg, G5 *K. pinnata* 100 mg e G6 *K. pinnata* 10 mg. ### significância estatística ( $p < 0,001$ ), # significância estatística ( $p < 0,05$ ), \*\*\*significância estatística ( $p < 0,001$ ), \*\* significância estatística ( $p < 0,01$ ), \* significância estatística ( $p < 0,05$ ) nos níveis de AST e ALT dos animais dos grupos Controle e tratados com Artemisinina 100 mg, *K. pinnata* 200 mg, *K. pinnata* 100 mg e *K. pinnata* 10 mg quando comparados ao grupo Malária (ANOVA, seguido do teste Tukey). .....61

**Figura 15-** Avaliação da função renal (concentração de creatinina e uréia sanguíneas). Cada barra representa média + Desvio padrão dos níveis de creatinina e uréia em mg/dL dos animais analisados no 11<sup>o</sup> dia de tratamento após a inoculação do *P. berghei*, nos grupos experimentais G2 Malária, G3 Artemisinina, G4 *K. pinnata* 200 mg, G5 *K. pinnata* 100 mg e G6 *K. pinnata* 10 mg. ### significância estatística ( $p < 0,001$ ) \*\*\*significância estatística ( $p < 0,001$ ), nos níveis de creatinina e uréia dos animais dos grupos Controle e tratados com Artemisinina 100 mg, *K. pinnata* 200 mg, *K. pinnata* 100 mg e *K. pinnata* 10 mg quando comparados ao grupo Malária (ANOVA, seguido do teste Tukey). .....63

**Figura 16-** Avaliação dos parâmetros hematológicos. Cada barra representa média + Desvio padrão dos níveis de eritrócitos ( $10^6/\mu\text{L}$ ), hemoglobinas (g/dL) e plaquetas ( $10^3/\mu\text{L}$ ) dos animais analisados no 11<sup>o</sup> dia de tratamento após a inoculação do *P. berghei*, nos grupos experimentais G2 Malária, G3 Artemisinina, G4 *K. pinnata* 200 mg, G5 *K. pinnata* 100 mg e G6 *K. pinnata* 10 mg. ### significância estatística ( $p < 0,001$ ), \*\*\*significância estatística ( $p < 0,001$ ), \*\* significância estatística ( $p < 0,01$ ), \* significância estatística ( $p < 0,05$ ) nos níveis de eritrócitos, hemoglobina e plaquetas dos animais dos grupos Controle e tratados com Artemisinina 100 mg, *K. pinnata* 200 mg, *K. pinnata* 100 mg e *K. pinnata* 10 mg quando comparados ao grupo Malária (ANOVA, seguido do teste Tukey). .....64

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b> Atividades medicinais da <i>K. pinnata</i> .....	36
<b>Tabela 2-</b> Análise da média (n=3) da massa corporal (gramas $\pm$ desvio padrão) de camundongos BALB/c tratados com extrato de <i>K. pinnata</i> na dose de 5 mg/kg. .	54
<b>Tabela 3-</b> Análise da Média (n=3) da massa corporal (gramas $\pm$ desvio padrão) de camundongos BALB/c tratados com extrato de <i>K. pinnata</i> na dose de 50 mg/kg. ....	54
<b>Tabela 4-</b> Análise da média (n=3) da massa corporal (gramas $\pm$ desvio padrão) de camundongos BALB/c tratados com extrato de <i>K. pinnata</i> na dose de 300 mg/kg. ....	55
<b>Tabela 5-</b> Análise da média (n=3) da massa corporal (gramas $\pm$ desvio padrão) de camundongos BALB/c tratados com extrato de <i>K. pinnata</i> na dose de 2000 mg/kg. ....	55

## LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

ALT	Alanina Aminotransferase
ANOVA	Análise de Variância
AST	Aspartato Aminotransferase
ATP	Adenosina tri-fosfato
Célula NK	Natural Killer Cell
Célula NKT	Natural Killer T Cell
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EDTA	Ácido Etilenodiamino Treta-acético
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IFN- $\gamma$	Interferon gama
IL-1	Interleucina 1
IL-1 $\beta$	Interleucina-1 $\beta$
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IRA	Insuficiência Renal Aguda
K.P.	<i>Kalanchoe pinnata</i>
<i>P. berghei</i> :	<i>Plasmodium berghei</i>
<i>P. chabaudi</i>	<i>Plasmodium chabaudi</i>
<i>P. falciparum</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
<i>P. malariae</i>	<i>Plasmodium malariae</i>
<i>P. ovale</i>	<i>Plasmodium ovale</i>
<i>P. vinckei</i>	<i>Plasmodium vinckei</i>
<i>P. vivax</i>	<i>Plasmodium vivax</i>
<i>P. yoelii</i> :	<i>Plasmodium yoelii</i>
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SIVEP:	Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica
UFOPA	Universidade Federal do Oeste do Pará

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
1.1	A MALÁRIA NO MUNDO E NO BRASIL.....	11
1.2	CARACTERÍSTICAS DA MALÁRIA.....	13
1.3	CICLO BIOLÓGICO DO PLASMÓDIO.....	15
1.4	PATOGENIA DA MALÁRIA.....	17
1.4.1	<b>Alterações hematológicas na Malária</b> .....	<b>18</b>
1.4.2	<b>Lesão renal na malária</b> .....	<b>19</b>
1.4.3	<b>Lesão hepática na malária</b> .....	<b>21</b>
1.4.4	<b>Resposta imunológica na malária</b> .....	<b>23</b>
1.5	DROGAS ANTIMALÁRICAS.....	26
1.5.1	<b>Mecanismo de ação dos antimaláricos</b> .....	<b>28</b>
1.6	PRODUTOS NATURAIS COM AÇÃO ANTIMALÁRICA.....	31
1.6.1	<b>O gênero <i>Kalanchoe</i></b> .....	<b>32</b>
1.6.2	<b>Composição química do extrato da <i>K. pinnata</i></b> .....	<b>34</b>
1.6.3	<b>Propriedades medicinais do extrato da <i>K. pinnata</i></b> .....	<b>35</b>
1.7	MODELOS EXPERIMENTAIS EM MALÁRIA.....	37
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>40</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>41</b>
3.1	OBJETIVO GERAL.....	41
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	41
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>42</b>
4.1	COLETA DA PLANTA E PREPARAÇÃO DO EXTRATO DA <i>K. PINNATA</i> .....	42
4.2	ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DO EXTRATO DA <i>K. PINNATA</i> .....	42
4.3	ANÁLISE QUANTITATIVA DE COMPOSTOS FENÓLICOS NO EXTRATO <i>K. PINNATA</i> .....	43
4.4	ANIMAIS.....	43
4.5	AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA.....	43
4.6	PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.....	44
4.7	MANUTENÇÃO DA CEPA DE <i>PLASMODIUM BERGHEI</i> .....	46
4.8	INDUÇÃO DO MODELO EXPERIMENTAL.....	46

4.9	DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE PARASITÁRIA E SUPRESSÃO PARASITÊMICA.....	46
4.10	ANÁLISE DE SOBREVIDA PÓS-TRATAMENTO COM O EXTRATO DE <i>K. PINNATA</i> 47	
4.11	DETERMINAÇÃO DA GLICOSE PLASMÁTICA .....	47
4.12	PARÂMETROS DE FUNÇÃO HEPÁTICA .....	48
4.13	PARÂMETROS DE FUNÇÃO RENAL .....	48
4.14	PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS .....	48
4.15	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	49
<b>5</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>50</b>
5.1	ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DO EXTRATO DA <i>K. PINNATA</i> .....	50
5.2	AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA.....	53
5.3	AVALIAÇÃO DA MASSA CORPORAL NOS GRUPOS EXPERIMENTAIS .....	55
5.4	TEMPO DE SOBREVIDA DOS ANIMAIS INFECTADOS PELO <i>P. BERGUEI</i> APÓS O TRATAMENTO COM AS DIFERENTES DOSES DE <i>K. PINNATA</i> .....	56
5.5	DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE PARASITÁRIA E SUPRESSÃO SISTÊMICA 57	
5.6	AVALIAÇÃO DA GLICOSE PLASMÁTICA.....	59
5.7	AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO HEPÁTICA .....	60
5.8	AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO RENAL .....	62
5.9	PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS .....	63
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>65</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>74</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>76</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 A MALÁRIA NO MUNDO E NO BRASIL

A malária é uma doença infecciosa conhecida desde a era pré-cristã e que tem como causa um parasita microscópico de origem africana que há milhões de anos se espalhou para as regiões do Velho Mundo através das migrações. Segundo relatório anual da Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2016 ocorreram 216 milhões de casos de malária no mundo, com 445.000 mortes, sobretudo de crianças na África (WHO, 2017).

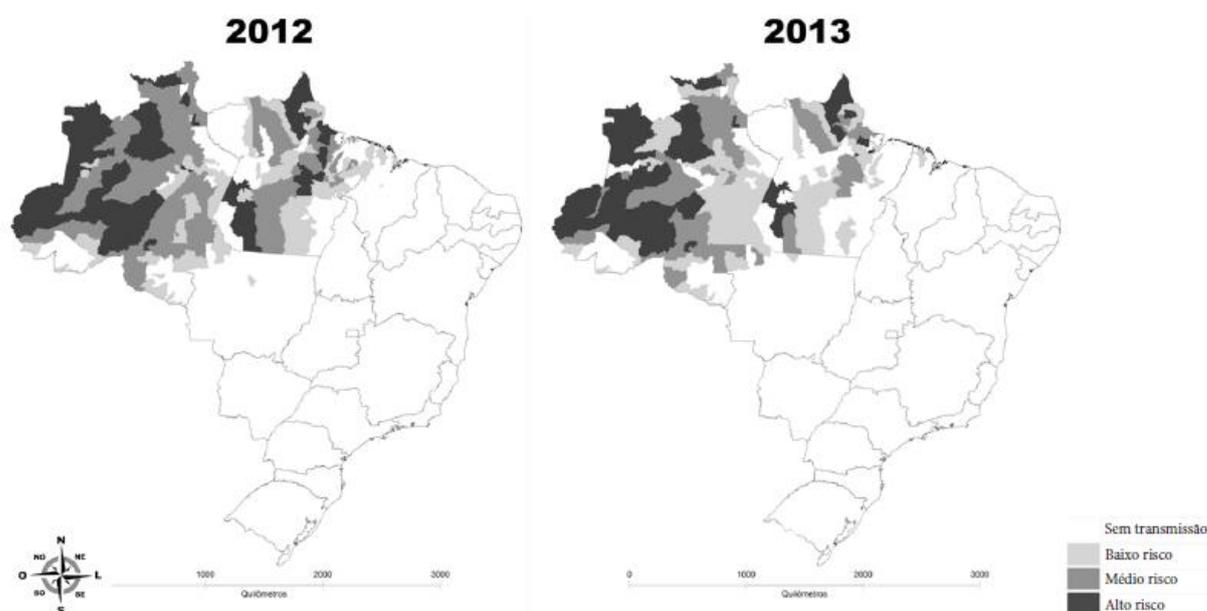
Mesmo sendo um problema mundial, a malária não apresenta uma distribuição geográfica homogênea, onde sua maior incidência global encontra-se em regiões tropicais e subtropicais como África, Ásia e América Latina (REY, 2011, RIDDER et al, 2008; AMIR; AHMADAN, 2009). Zonas hiperendêmicas ocorrem principalmente na África Central (das costas do Oceano Atlântico às do Índico), na África no Norte, Sul e Sudoeste da Europa, Ásia, América Central, no Norte e Centro da América do Sul (WHO, 2017).

Nas Américas (América do Sul e Caribe), segundo o Relatório Mundial de Malária (2017), a taxa de infecção dessa doença vem aumentando desde 2013, com número confirmado de 850.000 casos de malária em 2016. O relatório ainda ressalta que Brasil e Colômbia são os países que concentram o maior número de casos dessa região, e que nestes países o aumento no número de doentes pode estar relacionado a condições precárias de moradia e saneamento básico (WHO, 2017).

O quadro epidemiológico da malária no Brasil é preocupante nos dias atuais. Embora em declínio, o número absoluto de casos de infecção por malária, no ano de 2013 ainda foi superior a 170.000 pacientes em todo o país, com maior parte destes ocorrendo nos estados da Amazônia Legal, que engloba os estados do Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins. O norte do país é a região que concentra o maior número de casos de malária, estimando-se a ocorrência de 235.078 notificações positivas no ano de 2012 e 169.570 em 2013 seguindo a tendência do mapa de risco na Figura 1 (BRASIL, 2015).

Dentre o número de notificações, o *Plasmodium vivax* é a espécie causadora de quase 80% dos casos. No entanto, a transmissão do *P. falciparum*, sabidamente responsável pela forma grave e letal da doença, e este tem apresentado aumento nos últimos anos, o que pode agravar ainda mais os números de óbitos. Entretanto, a frequência de internações e óbitos relacionados à malária no Brasil também vem mostrando declínio. No ano de 2012 registraram-se 3.328 internações, enquanto em 2013 ocorreram 2.355 internações, uma redução 29,2% em comparação ao ano anterior (BRASIL, 2015).

**Figura 1** – Risco da malária, segundo o índice parasitário anual no Brasil, para os anos de 2012 e 2013



Fonte: Sivep-Malária/SVS/MS (atualizado em 31/10/2014).

A maior taxa de incidência da doença na Amazônia se deve ao fato de ser uma região onde as condições de saneamento e socioambientais da população são favoráveis para existência do vetor. Além disso, algumas pessoas residem em locais de difícil acesso, onde ficam desamparados em relação à saúde básica, reduzindo a possibilidade de diagnóstico e contribui para a subnotificação da doença (MENEQUETTI *et al.*, 2014, SILVA-NUNES *et al.*, 2012).

De acordo com Gomes (2011) a malária é uma doença de notificação obrigatória no Sistema Único de Saúde (SUS), que tem como diagnóstico confirmatório o exame de investigação do parasito em sangue periférico em lâmina microscópica por gota

espessa, considerado o padrão ouro para o diagnóstico da malária pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Além disso, o emprego de testes de diagnóstico rápido (WILSON, 2012), utilizados nas localidades em que se identificou dificuldade de acesso ao diagnóstico em menos de 24 horas, ou onde é inviável a implantação e manutenção de um posto com diagnóstico microscópico para malária (BRASIL, 2005).

Dentre os estados da Amazônia Legal, o Pará apresenta o terceiro maior número de casos da doença, atrás somente do Amazonas e Acre (BRASIL, 2015). Além disso, de 2015 a 2017 o número de casos mais que triplicou. Subiu de 11.266 para 36.382, de acordo com a Secretaria de Estado de Saúde Pública (Sespa). Além disso, as zonas rurais e os garimpos juntos representam até 80% destas notificações o que pode estar relacionado aos fatores supracitados por Meneguetti e colaboradores (2014).

De acordo com estudo realizado por Sousa e colaboradores (2015), os dados epidemiológicos da malária na Região do Baixo Amazonas, estado do Pará, apontam a presença constante da malária nos municípios da região, sendo notificados 16.765 casos no período do estudo. Municípios da região oeste do estado apresentaram altos números de casos no ano de 2017, como Itaituba (2086), Almeirim (587), Óbidos (196), Jacareacanga (957) Santarém (27) e Alenquer (144) (BRASIL, 2018).

Apesar dos estudos epidemiológicos demonstrarem uma redução dos casos de malária no período de 2009 a 2013 na região do baixo Amazonas, o município de Santarém ainda é responsável por 40% do número de notificações. No entanto, o número de notificações do município pode estar relacionado com incremento de casos importados, uma vez que, a cidade é referência em serviços de saúde para o oeste do Pará, devido aos seus recursos médicos assistenciais (SOUSA *et al.*, 2015).

## 1.2 CARACTERÍSTICAS DA MALÁRIA

A malária é uma protozoose, ocasionada por um parasito pertencente à família *Plasmodidae*, gênero *Plasmodium*. Esse gênero é caracterizado por apresentar dois tipos de multiplicação: uma assexuada denominada esquizogonia, que ocorre no hospedeiro vertebrado (aves, répteis e mamíferos) e outra sexuada chamada de esporogonia, que ocorre no hospedeiro invertebrado e vetor da doença, o mosquito do gênero *Anopheles* (GERALD, 2011).

Dentre as características do gênero *Plasmodium* estão: parasitas são intracelulares obrigatórios que apresentam dois hospedeiros, um vertebrado e outro invertebrado para completar seu ciclo de vida, notável complexidade biológica com variadas formas evolutivas, diferentes características antigênicas e variado potencial patogênico somado ao desenvolvimento de vários mecanismos de escape do parasita à ação do sistema imunológico (QUEIROZ, 2007).

Dentre as espécies causadoras da doença ao homem estão o *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* e *Plasmodium ovale*. A transmissão horizontal da malária ocorre por meio da picada de fêmeas infectadas de mosquitos do gênero *Anopheles*, sendo a mais importante a espécie *Anopheles darlingi*, que apresenta hábitos antropofílicos com atividade noturna cíclica contínua, com pico nos crepúsculos matutino e noturno e cujos criadouros preferenciais são locais com água limpa, quente e área sombreada (BRASIL, 2010; RIDDER *et al.*, 2008).

A transmissão vertical pode ocorrer acidentalmente por transfusão de sangue (sangue contaminado com plasmódio), pelo compartilhamento de seringas (em usuários de drogas ilícitas) ou por acidente com agulhas e/ou lancetas contaminadas. Há, ainda, a possibilidade de transmissão neonatal (BRASIL, 2005).

O *Plasmodium falciparum* existe em todas as regiões tropicais sendo a espécie que causa a malária mais grave em humanos provocando fatalidades, invadindo por muitas vezes 20% dos eritrócitos totais. Sua incubação é curta (de 6 a 10 dias) e infecta mais frequentemente os eritrócitos que se encontram no fígado ou baço, e muitas vezes não é detectado no sangue periférico. As hemácias apresentam tamanhos aumentados e distorcidos, e apresentam grânulos avermelhados (BUFFET *et al.*, 2011).

O *Plasmodium vivax* é a espécie responsável pelo maior número de infecções, entretanto não é comum causar complicações graves (WILSON *et al.*, 2004). *P. vivax* pode permanecer no fígado durante muitos anos, levando a formação de formas latentes como os hipnozoítos e, podendo ocorrer uma possível recaída anos mais tarde. O seu período de incubação é de cerca de 15 dias. O *Plasmodium ovale* é semelhante ao *Plasmodium vivax* possuindo o mesmo período de incubação e a formação de hipnozoítos, no entanto, infecção por esta espécie é mais comum em regiões da África e Ásia. O *Plasmodium malariae* é bastante raro no Brasil, sendo

infrequente o aparecimento de casos graves de malária ocasionados por este parasito, devido a seu período de incubação de várias semanas, até meses e anos (JORGE, 2014).

### 1.3 CICLO BIOLÓGICO DO PLASMÓDIO

O ciclo biológico do agente causador da malária está dividido em duas fases de reprodução, assexuada e sexuada, que ocorrem em diferentes hospedeiros. A fase assexuada do *Plasmodium* denominado esquizogônico inicia-se após a picada de mosquitos fêmeas do gênero *Anopheles*, com a inoculação de esporozoítos infectantes no homem. A seguir, os esporozoítos circulam na corrente sanguínea durante 30 a 60 minutos penetrando nas células do fígado (hepatócitos) dando início ao ciclo pré-eritrocítico ou esquizogonia tecidual (GERALD, 2011; SINDEN, 2009) VAUGHAN; ALY; KAPPE, 2008).

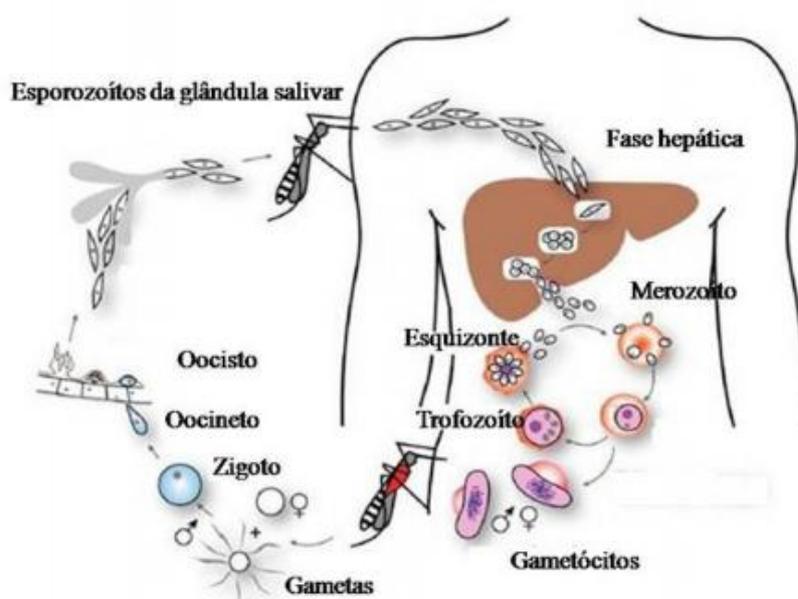
Ao final do ciclo pré-eritrocítico, os esquizontes rompem os hepatócitos liberando a forma merozoíta do parasito na corrente sanguínea com uma quantidade aproximada de 2.000 merozoítas liberados quando a infecção é causada pelo *Plasmodium malariae*, 10.000 quando causada pelo *Plasmodium vivax* e 40.000 pelo *Plasmodium falciparum* (ANTINORI *et al.*, 2012; MATTEELLI; CASTELLI, FRANCESCO, 2018).

Os merozoítos invadem as hemácias, dando início ao segundo ciclo de reprodução assexuada: o ciclo sanguíneo ou eritrocítico. Durante um período que varia de 48 a 72 horas o parasita se desenvolve no interior da hemácia até provocar a sua ruptura liberando novos merozoítos que irão invadir novas hemácias. Após um período de replicação assexuada, alguns merozoítos se transformam em trofozoítos e outros se diferenciam em gametócitos machos e fêmeas, que amadurecem sem divisão celular e se tornam infectantes ao mosquito (JOSLING; LLINÁS, 2015).

Parasitas sanguíneos assexuados não possuem a capacidade de infectar o mosquito de forma produtiva. A transmissão de parasitas do hospedeiro humano para o mosquito requer diferenciação sexual no sangue em gametócitos (JOSLING; LLINÁS, 2015). A função desses gametócitos é reprodutiva, isto é, garantir a perpetuação da espécie. Eles podem ser de dois tipos, diferenciados

microscopicamente nos esfregaços sanguíneos: os microgametócitos (masculinos) e os macrogametócitos (femininos) (ALANO, 2007; BRASIL, 2005)

**Figura 2-** Ciclo de vida do *Plasmodium*



Fonte: Cowman *et al.* (2012)

A reprodução sexuada (esporogônica) do parasito da malária ocorre no estômago do mosquito, após a diferenciação dos gametócitos em gametas e a sua fusão, com formação do ovo (zigoto). Este se transforma em uma forma móvel (oocineto) que migra até a parede do intestino médio do inseto, formando o oocisto, no interior do qual se desenvolverão os esporozoítos. O tempo requerido para que se complete o ciclo esporogônico nos insetos varia com a espécie de *Plasmodium* e com a temperatura, situando-se geralmente em torno de 10 a 12 dias. Os esporozoítos produzidos nos oocistos são liberados na hemolinfa do inseto e migram até as glândulas salivares, de onde são transferidos para o sangue do hospedeiro humano durante o repasto sanguíneo (BRASIL, 2005; JOSLING; LLINÁS, 2015).

A infecção pelo *Plasmodium* pode seguir dois cursos clínicos de evolução, a forma simples ou não complicada da malária e a forma grave ou complicada da doença, cuja classificação ocorre de acordo com os sintomas e consequências clínicas que a malária promove. Na forma simples o paciente apresenta um quadro clínico clássico de febre cíclica, seguido de intenso calafrio e sudorese profusa,

náuseas, vômito, palidez, debilidade física, sem parasitemia intensa ou outras complicações. Os sinais e sintomas clínicos na malária são manifestações decorrentes tanto da presença do parasita, como da intensidade da resposta imune do hospedeiro contra antígenos específicos do parasita. A principal característica clínica da malária em indivíduos que ainda não adquiriram algum grau de proteção é a tríade malárica, constituída principalmente por febre, calafrios e cefaleia (KARUNAWEERA *et al.*, 2003).

Malária grave normalmente é causada pelo *Plasmodium falciparum*, e o paciente pode apresentar intensa parasitemia, o que gera complicações como esplenomegalia, dor de cabeça grave, isquemia, lesões cerebrais, convulsões, vômito intenso, hepatomegalia, hemoglobinúria, hipoglicemia, coagulopatias, acidose metabólica, complicações pulmonares e insuficiência renal, podendo evoluir ao coma e morte (RIDDER *et al.*, 2008; BRASIL 2010; HANSEN; SCHOFIELD, 2010).

#### 1.4 PATOGENIA DA MALÁRIA

A malária é causada por protozoários do gênero *Plasmodium* e dentro desse gênero, quatro espécies causam a maioria das infecções em humanos. São elas *P. malariae*, *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. ovale*. O *Plasmodium falciparum* demonstra ser o agente mais patogênico e letal da malária. Já o *Plasmodium vivax* é responsável por uma forma mais benigna da doença (RIDDER *et al.*, 2008).

A maioria das mortes é causada pelo *P. falciparum*. A infecção começa quando a fêmea do mosquito *Anopheles* inocula a forma esporozoíta do *Plasmodium*. Essas formas são transportadas até o fígado e começam a reprodução assexuada. Esse processo de amplificação é conhecido como esquizogonia (WHITE; BREMAN, 2017).

A periodicidade da esquizogonia sanguínea é variável de acordo com a espécie – 48 horas no caso de *P. falciparum* e *P. vivax*, 72 horas para o *P. malariae* e até 50 horas para *P. Ovale* (GOMES *et al.*, 2011). As células do fígado se rompem e liberam merozoítos na corrente sanguínea, que invadem os eritrócitos e se multiplicam. Quando os parasitas atingem o número de 100 milhões no sangue de um adulto, começa a fase sintomática da infecção. Nas infecções por *P. ovale* e *P. vivax* a forma denominada hipinozoíta hepática permanece em latência, onde esse período pode durar um ano ou mais podendo causar recaídas (WHITE; BREMAN, 2017).

Em humanos a doença é causada pela destruição eritrocitária e pela reação do hospedeiro (WHITE; BREMAN, 2017). No entanto, vários fatores como a resposta imunológica, idade do hospedeiro, o quadro de primo ou reinfeção, infecções mistas (por duas espécies de plasmódios) ou pelo *P. falciparum* são agravantes e podem contribuir para um mau prognóstico da malária. A ação sistêmica do parasito promove complicações fisiopatológicas sobre os diversos órgãos, atingindo principalmente o cérebro, rins e fígado. Desvendar estes eventos lesivos, que podem levar a forma grave da doença não é uma tarefa simples. As complicações são mediadas por diversos sistemas orgânicos acionados durante o processo inflamatório induzido pela infecção (COWMAN; BERRY; BAUM, 2012).

#### **1.4.1 Alterações hematológicas na Malária**

A anemia grave é uma manifestação frequente e precoce da malária e pode acontecer por sequestro dos eritrócitos no baço, alteração da eritropoese e perda sanguínea decorrente de coagulopatia. A anemia causada pela malária pode ser definida como a redução da hemoglobina ou do hematócrito abaixo dos níveis esperados de acordo com sexo, idade e condição na presença de *Plasmodium* spp (GOMES et al, 2011).

Na malária grave, o parasito possui a capacidade de alterar as proteínas de membrana das células eritrocíticas infectadas, lhe conferindo uma forma irregular e diminuindo sua flexibilidade, o que está relacionado ao prognóstico e desenvolvimento de anemia. Em alguns indivíduos a anemia pode se desenvolver de forma rápida e a transfusão pode ser necessária. Além disso, anormalidades leves da coagulação podem ocorrer na malária *falciparum*, e trombocitopenia é usual. Dos pacientes com a forma de malária mais grave, menos de 5% tem sangramento significativo com evidências de coagulação vascular disseminada (WHITE; BREMAN, 2017).

Estudos demonstraram que infecções por vírus, como por exemplo o vírus HIV, bacterianas e parasitárias, como helmintíase, estão ligadas a maior probabilidade de desenvolvimento e maior gravidade da anemia na infecção pelo *P. falciparum*, além de alterações genéticas e deficiências nutricionais (GOMES et al, 2011).

### 1.4.2 Lesão renal na malária

A malária é a primeira infecção parasitária que foi claramente demonstrada como associada à síndrome nefrótica em áreas tropicais (GIGLIOLI, 1962; KIBUKAMUSOKE *et al.*, 1967). *P. malariae* e *P. falciparum* são comumente associadas à doença glomerular, embora alguns casos com função renal anormal tenham sido associados à infecção por *P. vivax* (BARSONUM, 2000, WICHAPOON *et al.*, 2014; SILVA JÚNIOR *et al.* 2017)

A presença de disfunção renal em pacientes com infecção por malária indica uma doença mais grave com altas probabilidades de mais complicações e um mau prognóstico. A remessa tardia, doença aguda curta, parasitemia alta, apresentação com oligúria, hipotensão, anemia grave, icterícia significativa, diarreia grave, envolvimento multissistêmico, hepatite, dificuldade respiratória aguda, idade jovem e esplenomegalia são fatores de risco potenciais associados à maior mortalidade na malária nefropática. Além disso, infecções virais ou bacterianas pulmonares oportunistas podem ser encontradas em pacientes com insuficiência renal aguda (IRA), aumentando o risco de mortalidade (BARSOU, 2000).

As lesões renais (glomerulonefrite, nefrite, síndrome nefrótica) associadas à malária podem ser divididas em agudas e crônicas. As lesões agudas caracterizam-se pelo desenvolvimento de anomalias urinárias e deposição de imunoglobulinas, complemento e antígenos no glomérulo a partir da segunda semana de infecção. Estas lesões são reversíveis e ocorrem principalmente na infecção pelo *P. falciparum*. As lesões descritas na infecção pelo *P. malariae* se desenvolvem lentamente e tendem a progredir para lesões crônicas. Em adultos as lesões crônicas mais comuns são glomerulonefrite proliferativa, inchaço do tufo glomerular e proliferação das células endoteliais (SCHRIER, 2007).

Na malária causada pelo *P. falciparum* as alterações glomerulares são: hiperplasia glomerular, aumento das células endoteliais em tamanho e número, irregularidade na espessura da membrana basal, proliferação mesangial, hipertrofia das células epiteliais com fusão dos podócitos e depósito de complexo imune (EL-SHOURA, 1994). O prognóstico da IRA associada a *P. vivax* é favorável e os medicamentos antimaláricos continuam a apresentar complicações no tratamento da insuficiência renal aguda da malária.

As lesões renais também podem ser observadas em infecções experimentais. Estudos histopatológicos em ratos infectados pelo *P. chabaudi* confirmaram a presença de glomerulonefrite com aumento e celularidade dos tufo glomerulares, inchaço do epitélio tubular principalmente entre o quinto e sétimo dia de infecção (MUSOKE *et al.*, 1977, MOTTA, 2003).

A infecção por *Plasmodium chabaudi* em camundongos da linhagem BALB/c é normalmente caracterizada pela mudança da resposta dos linfócitos T-helper. Durante a primeira semana da infecção observa-se uma resposta Th1, caracterizada pela produção de interferon gama e interleucina 2 (IL-2) seguida por uma resposta Th2, caracterizada pela produção de IL-4 e anticorpos. Esta mudança na resposta Th é observada geralmente no momento do pico da infecção (Helmy *et al.*, 2000).

Nas infecções causadas pelo *P. falciparum* as alterações tubulares são mais proeminentes do que as glomerulares, podendo variar desde um acometimento de pequena monta até necrose tubular aguda e insuficiência renal aguda (IRA), frequentemente oligúrica e hipercatabólica (HALDAR, 2008). Considera-se o diagnóstico da IRA nas situações em que há oligúria - diurese inferior a 400 mL/24 horas - e elevação sérica de creatinina e uréia. A causa de IRA decorrente de malária por *P. falciparum* é, provavelmente, uma glomerulonefrite mediada por complexos imunes causada por deposição destes complexos e lesão endotelial, que pode acarretar uma evolução fatal (GOMES, 2011).

Isso resulta na formação de rosetas intravasculares e aglomerados que podem impedir a microcirculação de órgãos internos. Embora este recurso seja observado com todos, a citoestrutura endotelial, o sequestro aumenta a viscosidade do sangue total e a obstrução do lúmen capilar por células pegajosas (GOMES, 2011).

As alterações hemodinâmicas são geralmente confirmadas por serem mais pronunciadas na malária *falciparum* do que em outros tipos de malária. O efeito das hemácias infectadas na microcirculação é o principal fator fisiopatogênico da IRA, além dos eventos hemodinâmicos, imunológicos, elevação sérica de creatinina e uréia e alterações metabólicas (CLARCK, 2006). O fenômeno da citoaderência e os eventos embólicos na microcirculação, além da diminuição da deformabilidade das hemácias culminam na redução do fluxo sanguíneo sistêmico e consequente isquemia renal (CLARK, 2006, WHO, 2000). O componente hemodinâmico responsável pelo

acometimento renal não está limitado aos eventos microembólicos; envolve também a ativação endotelial mediada pela maciça liberação de citocinas vasoativas, hipovolemia e a redução da viscosidade sanguínea, tal como observado em quadros de sepse (WHO, 2000).

Os mediadores inflamatórios liberados pela resposta imunológica induzem a vasoconstrição e a liberação de catecolaminas, as quais aumentam ainda mais o efeito vasoconstritor. O consequente dano renal decorrente dessas alterações está ligado à toxicidade direta das catecolaminas sobre o parênquima renal, assim como às implicações hemodinâmicas que culminam em isquemia. Outros mecanismos como a deposição de imunocomplexos e a glomerulopatia imunomediada também contribuem para a lesão renal. A contribuição da malária para a admissão hospitalar geral para IRA varia de 2-39% de acordo com a prevalência local da doença (PRAKASH, 2003).

A sobrevivência dos pacientes com IRA melhorou consideravelmente devido aos avanços recentes em técnicas de diagnóstico, terapia de reposição e tratamento de diálise (NAQVI *et al.*, 2003). No entanto, o diagnóstico e o tratamento da disfunção renal associada à infecção por malária continuam a levar alguns desafios para os clínicos. A medida que se aprende mais sobre a patogênese da infecção por malária, podem ocorrer melhorias nos métodos de diagnóstico e prevenção da nefropatia causada por esses organismos (ELSHEIKHA; SHEASHAA, 2007).

#### **1.4.3 Lesão hepática na malária**

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, os sinais de hepatopatia ocasionada pela malária são incomuns em casos de malária. No entanto, nos últimos anos, os sinais de maior envolvimento foram cada vez mais relatados nos países asiáticos, especialmente na Índia, com uma grande parte dos casos que sofrem de malária *falciparum*. Foram relatados casos com testes de funções hepáticas alteradas e até mesmo insuficiência hepática fulminante (FAZIL *et al.*, 2013).

O envolvimento hepático na malária, manifesta-se, principalmente, por icterícia (à custa de bilirrubina direta), hepatomegalia e discreta elevação do nível sérico das aminotransferases. Trata-se de uma enfermidade com características histopatológicas distintas, podendo, em alguns casos, induzir a alterações na função

do órgão, como: redução na síntese dos fatores de coagulação, dificuldade no metabolismo de alguns antimaláricos e alterações na gliconeogênese contribuindo para a ocorrência da hipoglicemia e acidose láctica e chegando, eventualmente, à insuficiência hepática aguda (REULING, *et al.* 2018)

A hepatite resultante da infecção pelo *Plasmodium* é caracterizada por hiperbilirrubinemia (> 3 mg / dL) e elevadas enzimas transaminase de até mais de 3 vezes os níveis normais, pode ocasionar a adesão de eritrócitos parasitados as paredes endoteliais dos capilares hepáticos levando ao bloqueio dos canais intra-hepáticos, causando alterações no fluxo sanguíneo e conseqüentemente isquemia. Como resultado, ocorrem complicações como a encefalopatia hepática, a falha multiorgânica e a síntese protéica contaminada. Estudos histopatológicos revelaram necrose de hepatócitos, colestases, lesões granulomatosas e nódulos de malária (BAHETI, 2003)

A icterícia também está sendo observada mais comumente em casos de malária do sudeste asiático, onde ocorrem muitos casos isolados de disfunção hepática na malária. A presença de icterícia geralmente leva a um diagnóstico equivocado de hepatite viral, o que, por sua vez, leva a um tratamento inadequado e, freqüentemente, a uma morte evitável. A maioria dos dados publicados sobre o envolvimento hepático na malária vem de estudos clínicos (CORTINA; TOBON, 2010; KOCHAR, 2006).

As alterações histopatológicas hepáticas que ocorrem em casos de malária são principalmente conhecidas pela análise de biópsias coletadas de um pequeno número de pacientes (DAS *et al.*, 2007). Na presença de infecção por *P. Falciparum*, o diagnóstico de hepatopatia ocasionado por malária é realizado quando: os níveis de transaminases é pelo menos três vezes maior que valor de referências com ou sem hiperbilirrubinemia conjugada e na ausência de evidências clínicas ou sorológicas de hepatite viral. Há uma escassez de dados relacionados à hepatopatia do paludismo a nível global e um estudo dessa natureza fornecerá informações valiosas sobre a gravidade e os resultados da doença, de modo que as medidas de intervenção adequadas possam ser adotadas em estágio inicial (IWALOKUN, 2006).

A extensão do envolvimento hepático varia de uma anormalidade mínima nos testes de função hepática a um encefalopatia hepática. Segundo Saya (2012), a hepatopatia da malária está associada a uma maior incidência de complicações como insuficiência renal, choque, síndrome de dificuldade respiratória aguda e hipoglicemia.

São necessários mais estudos para elucidar os fatores associados à hepatopatia da malária e prevenir as complicações e a mortalidade. A prevenção secundária pelo diagnóstico precoce e tratamento da malária de *P. falciparum* também são importantes no sistema de atenção primária à saúde, a fim de reduzir o peso da hepatopatia da malária e suas complicações.

A hemólise contribui significativamente para a elevação da bilirrubina na infecção grave por malária. O parasita, especialmente o *P. falciparum*, infecta um grande número de células que são destruídas no baço, resultando em anemia hemolítica. Isto é caracterizado por bilirrubina sérica elevada (fração dominante não conjugada), sem elevação significativa das enzimas hepáticas "Hepatite malária" é um termo comumente usado para descrever disfunção hepatocítica em malária grave e complicada. No entanto, a inflamação real do parênquima hepático é quase nunca vista. Isto na ausência de evidência de exposição a fármacos hepatotóxicos e a ausência de evidências clínicas ou sorológicas de hepatite viral faz com que a hepatopatia malária seja uma entidade única (CORTINA; TOBON, 2010)

A extensão da disfunção hepatocelular varia de alterações leves em testes de função hepática para insuficiência hepática. Os pacientes com disfunção hepatocelular na malária são mais propensos a desenvolver complicações, mas têm um desfecho favorável se o envolvimento hepático é reconhecido no início e gerenciado corretamente. É importante procurar meticulosamente disfunção hepática em pacientes com severemalaria, distingui-la da insuficiência hepática fulminante e administrá-la de forma agressiva (AYYUB, 2000).

A ampla variação nos relatos de icterícia e disfunções hepatocelulares na infecção grave por malária pode ser devida às condições geográficas, à endemia da malária na região de origem dos relatórios, aos grupos etários estudados, à epidemia das infecções relatadas e à coexistência da hepatite viral (RUPANI, 2009).

#### **1.4.4 Resposta imunológica na malária**

Fatores como patogenicidade do parasita, intensidade de transmissão, fatores econômicos, sociais e variações genéticas podem influenciar diretamente na susceptibilidade do hospedeiro e conseqüentemente o prognóstico da doença. Em áreas de alta endemicidade, as crianças são as mais susceptíveis à infecção. Dados

apontam que as crianças representam um quarto das mortes nessas áreas (SNOW *et al.*, 2001).

As diferenças na susceptibilidade de cada indivíduo junto a fatores genéticos contribuem para a resistência e tolerância às formas mais graves da doença. São exemplos, os polimorfismos da hemoglobina (hemoglobina C, S e talassemias) e a deficiência da enzima G6PD (WEATHERALL *et al.*, 2002). Exposições precedentes ao parasita e idade do indivíduo são fatores que determinam a intensidade de tais manifestações (GUINOVART *et al.*, 2012).

- **Imunidade Inata ou Inespecífica**

Resistência à infecção com bases genéticas e mecanismos imunológicos mediados por células são respostas de imunidade inata ou inespecífica contra os parasitas da malária (KORBEL *et al.*, 2004). O hospedeiro possui características genéticas que podem estar relacionadas a resistência natural, e talvez impeçam a invasão dos eritrócitos pelos merozoítas. Dessa forma, diminui o número dos parasitas dentro dos eritrócitos infectados, ou então pode causar danos na liberação destes merozoítas que compõem o esquizonte. Sendo assim, após o rompimento e liberação dos merozoítos das células infectadas, a capacidade dos mesmos de infectar novas hemácias é menor, interferindo com a manutenção do ciclo de vida do parasita (MCGILVRAY *et al.*, 2000).

Vários tipos celulares liberam citocinas que participam destes mecanismos, atuando contra os parasitas livres e/ou eritrócitos infectados (BOLAD; BERZINS, 2000). A lise direta do parasita é causada por moléculas do sistema complemento, os macrófagos fagocitam os eritrócitos parasitados e os parasitas livres, e os linfócitos NK (Natural Killer Cell) e NKT (Natural Killer T Cell) induzem a lise das células parasitadas (DIALLO *et al.*, 2008). As células dendríticas e macrófagos fagocitam as hemácias infectadas, e liberam citocinas as quais atuam na ativação das células NK. As células NK apresentam um importante papel na fonte inicial de IFN-gama (Interferon gama) e são responsáveis pela eliminação do parasita devido aos processos de citotoxicidade gerada em resposta ao parasita (ARTAVANIS-TSAKONAS *et al.*, 2002).

Entre as citocinas que participam da ativação da cascata estão a Interleucina-2 (IL-2), Interleucina-12 (IL-12), Interleucina-15 (IL-15), Interleucina-18 (IL-18) e o Fator

de Necrose Tumoral- $\alpha$  (TNF-  $\alpha$ ). As células apresentadoras de antígeno (CAA), tais como células dendríticas e macrófagos produzem a Interleucina-12, uma citocina inflamatória, é a mais potente indutora da citotoxicidade das células NK e da secreção de Interferon-gama (IFN-gama). As células NK são medidas a desenvolver um papel crucial na resposta imune inata, ativadas pelas IL-12, assim como a IL-18, combatem hemácias infectadas por parasitas da malária. Ela é um elo entre a resposta imune inata a imunidade adquirida, e esta citocina pró-inflamatória inicia o desenvolvimento de uma resposta imune do tipo Th1 (SU; STEVENSON, 2001).

Até que a imunidade adaptativa seja estabelecida, a resposta imune inata é de suma importância não somente para limitar a fase inicial de multiplicação do parasita como também a primeira leva de parasitemia, controlando a infecção (BUENO, 2011).

- **Imunidade Adquirida ou Específica**

Torna-se complexa a composição antigênica para o *Plasmodium*, por possuir várias formas evolutivas no ciclo de vida, e em cada fase destes protozoários ocorre a expressão preferencial de um conjunto de moléculas, necessárias para o estabelecimento da infecção das células hospedeiras e modulação da resposta imune. Logo, estímulos ao sistema imune geram um leque de respostas, entretanto específicas contra diferentes formas de cada estágio, assim, contribuindo para evitar a progressão da infecção. Diante desta resposta do sistema imune, o parasita desenvolve mecanismos de evasão das defesas do hospedeiro. (MALAGUARNERA; MUSUMECI, 2002).

Em todas as doenças infecciosas a colaboração da resposta imune celular é de suma importância para a defesa do organismo humano. Através de mecanismos de ação como fagocitose, produção de citocinas e mediadores citotóxicos, este tipo de resposta pode eliminar patógenos. A proliferação de células efetoras, como linfócitos TCD8+, além de linfócitos TCD4+ e linfócitos B, são resultados do estímulo ocasionados pelas citocinas. A apresentação de antígenos do parasita pelas células apresentadoras de antígeno (CAA), tais como células dendríticas, macrófagos e linfócitos B, inicia a proliferação de linfócitos T, que resultará na proliferação de clones específicos de linfócitos B e T, para eliminar o patógeno do organismo. Antígenos das formas esporozoíta e merozoíta são processados por CAA, durante o ciclo pré-eritrocítico, principalmente pelas células dendríticas, e apresentados aos linfócitos T

CD8+ e CD4+. A infecção das células hepáticas resultará na apresentação de antígenos do parasita associados às moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH) de classe I, reconhecimento e eliminação do hepatócito infectado por ação citotóxica de linfócitos TCD8+ (STRUİK; RILEY, 2004).

As células no sistema imune inato e adaptativo podem contribuir para o controle da parasitemia no momento da ruptura dos eritrócitos infectados contendo os merozoítas. Essencialmente mantendo os níveis compatíveis com a sobrevivência dos parasitas. A efetividade do sistema imune inato parece ser baixa contra os estágios sanguíneos do parasita, mas a resposta adaptativa confere algum grau de imunidade humoral e celular (STRUİK; RILEY, 2004).

A proteína circunsporozoíta (CS), localizada na superfície do parasita e a proteína de adesão relacionada à trombospondina (TRAP), até o presente momento são os principais antígenos das formas pré-eritrocíticas, descritos como capazes de ativar células TCD4+ e TCD8+, impedindo a invasão dos hepatócitos (SCHWENK; RICHIE, 2011). Diversas citocinas são geradas nesta resposta imune celular entre as principais estão, o Interferon-gama (IFN-gama) que inicia a resposta imune celular, ajudando para a eliminação de patógenos intracelulares, o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF-  $\alpha$ ) e a Interleucina 10 (IL-10) que é importante na regulação das respostas imunes do tipo Th1 e também atua prevenindo os danos teciduais desencadeados pela inflamação (TORRE *et al.*, 2002).

## 1.5 DROGAS ANTIMALÁRICAS

Os vários estágios do ciclo de vida do parasito da malária que ocorrem em humanos, diferem uns dos outros na sua morfologia, metabolismo e sensibilidade aos fármacos. Portanto, os fármacos antimaláricos podem ser classificados com base em suas atividades durante este ciclo de vida, bem como pelo seu uso pretendido para a quimioprofilaxia e tratamento (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012).

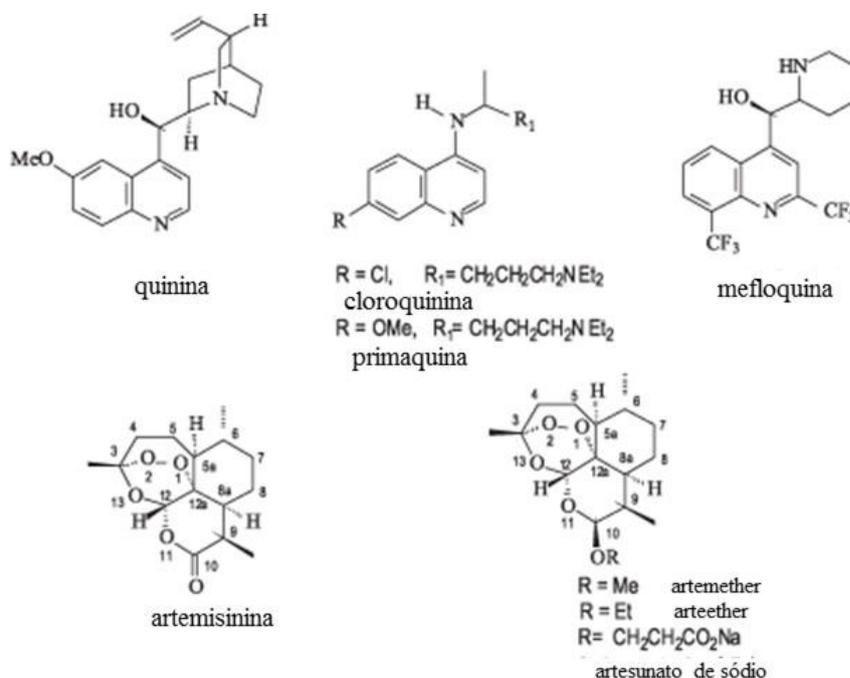
As primeiras drogas antimaláricas foram descobertas a partir de plantas, como a quinina isolada de espécies do gênero *Cinchona* e artemisinina oriunda da *Artemisia annua* L (ACHAN *et al.*, 2011). Atualmente o arsenal profilático e terapêutico para tratamento da malária está bastante restrito devido ao *Plasmodium falciparum* apresentar multirresistência a diversos fármacos, seja ela ocasionada pelo uso

irracional do medicamento ou pela capacidade evolutiva do parasito (CUI *et al.*, 2015; MOTA, 2009).

Desta forma, o tratamento da malária baseado na utilização de quimioterápicos, deve ser precedido de diagnóstico correto e escolha adequado dos medicamentos para que ocorra controle da doença. No Brasil, o Ministério da Saúde orienta a terapêutica e disponibiliza gratuitamente os medicamentos antimaláricos por meio de uma política nacional de tratamento da malária (FERREIRA, 2015).

Os fármacos antimaláricos podem ter ação contra mais de uma forma do protozoário e serem efetivos contra uma espécie, mas sem eficiência perante outras, por isso, o tratamento do paciente deve ser baseado em informações como: gravidade da doença, espécie de plasmódio, idade, histórico de exposição anterior à infecção e susceptibilidade dos parasitos aos antimaláricos convencionais (FERREIRA, 2015; FRANÇA; SANTOS; FIGUEROA-VILLAR, 2008). As principais drogas antimaláricas são: quinina, cloroquina, primaquina, mefloquina e artemisinina e seus derivados, como artesunato de sódio, artemether e arteether, cujas estruturas químicas estão ilustradas na Figura 3.

**Figura 3-** Estruturas químicas das principais drogas antimaláricas



fonte: adaptado de Braz Filho (2010).

### 1.5.1 Mecanismo de ação dos antimaláricos

Para que o plasmódio possa completar seu ciclo de vida em hospedeiro vertebrado, o parasita possui mecanismos para adaptar-se as ações fisiológicas do hospedeiro em cada fase de sua maturação e garantir suas necessidades nutricionais. Desta forma, os fármacos utilizados clinicamente para tratamento da malária agem em diferentes etapas do ciclo de vida do parasita, onde a maioria dos fármacos atuam inibindo a produção de hemozoína ou a síntese do ácido fólico (FRANÇA; SANTOS; FIGUEROA-VILLAR, 2008).

#### 1.5.1.1 Inibidores da produção de hemozoína

Quando a forma merozoíta se reproduz assexuadamente dentro das hemácias, os parasitas necessitam de uma enorme quantidade de nutrientes e, por terem capacidade limitada de sintetizar aminoácidos, eles suprem suas necessidades através da degradação da hemoglobina humana. Este processo, ocorre dentro do vacúolo digestivo do parasita e ocasiona a liberação do grupo heme ou ferriprotoporfirina IX (Fe (III) PPIX) que é tóxico ao parasita, devido a sua capacidade de gerar espécies reativas de oxigênio. Para evitar sua toxicidade, o Fe (III) PPIX é agregado, pelo parasita, em um pigmento cristalino, insolúvel e não tóxico chamado hemozoína. Os fármacos antimalariais agem então impedindo a conversão da hematina à hemozoína interferindo na cristalização desta (FRANCISCO, VARGAS, 2010; CUNICO *et al.*, 2008).

##### 1.5.1.1.1 Quinolínicos

**Cloroquina e Hidroxicloroquina:** Atuais evidências sugerem que as quinolinas interferem na detoxificação da heme. A cloroquina, uma base fraca, concentra-se nos vacúolos digestivos altamente acídicos do *Plasmodium*, onde se liga à heme e impede a sua captura. A incapacidade de inativar a heme ou ainda as maiores toxicidades dos complexos fármaco-heme são tidas como capazes de destruir os parasitos, em decorrência de lesão oxidativa das membranas, proteases digestivas ou biomoléculas críticas (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012).

A cloroquina é uma 4-aminoquinolona com rápida atividade esquizotóxica para todas as espécies e gametocitocida para *P. vivax* e *P. malariae*. Não tem ação contra as formas hepáticas. Além de seu efeito antimalárico, a cloroquina tem também ação

antipirética e anti-inflamatória. Poucas cepas de *P. falciparum* são ainda sensíveis à cloroquina (BRASIL, 2001).

**Primaquina:** atua contra os estágios hepáticos primários e latentes do *Plasmodium* sp. e previne recaídas de infecções provocadas por *P. vivax* e *P. ovale*. Este fármaco também exerce atividade gametocitocida contra o *P. falciparum* e outras formas de *Plasmodium*. Entretanto, a primaquina é inativa contra os parasitos em seu estágio sanguíneo assexuado (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012). A primaquina pode ser convertida em intermediários eletrofílicos que agem como mediadores da oxirredução. Tal atividade poderia contribuir para os efeitos antimaláricos ao gerar espécies reativas de oxigênio ou interferir no transporte de elétrons na mitocôndria no parasito (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012). Como hipnozoiticida, a primaquina deve ser sempre usada nas infecções naturais por *P. vivax*, objetivando destruir as formas hipnozoíticas. Como medicamento gametocitocida em infecções por *P. falciparum* (bloqueador de transmissão), o uso da primaquina deve ser reservado para a esterilização das infecções por *P. falciparum* em pessoas que se mudam para áreas onde o parasito foi eliminado, mas ainda sejam suscetíveis a sua reintrodução, e para áreas com níveis baixos de transmissão, onde estejam em andamento medidas para a eliminação dessa transmissão. Pode também ser empregada em controle de epidemias, porém sempre em simultaneidade com outras medidas, incluindo o controle de vetores. O tratamento antigametócitos não tem indicação onde, sabidamente, não exista o inseto vetor (BRASIL, 2001).

#### 1.5.1.1.2 Aril-alcoóis:

**Quinina:** A quinina é um potente esquizonticida que tem ação sobre todas as formas de *Plasmodium* humanos e, também, gametocitocida contra o *P. vivax*, *P. malarie* e *P. ovale*, mas não para o *P. falciparum*. O fármaco não tem efeito na forma inicial exo-eritrocítica do *Plasmodium*. Vem sendo usado isoladamente para malária por *P. falciparum* em áreas onde as cepas ainda não desenvolveram resistência, ou em associação com antibióticos para áreas com comprovada resistência a este antimalárico (GOMES, 2006). Acredita-se que o mecanismo de ação antimalárica da quinina se assemelhe ao da cloroquina, no fato de ambas serem capazes de se ligar à heme e impedir sua detoxificação (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012). Quando em uso isolado, associa-se a baixa adesão, devido à necessidade de

medicação por pelo menos sete dias, resultando em tratamento incompleto (BRASIL, 2001).

**Mefloquina:** A mefloquina é um quinolinometanol estruturalmente semelhante a quinina. É um forte esquizotocida de ação prolongada inclusive contra cepas de *P. falciparum* multirresistentes. É também efetiva contra os estágios eritrocíticos de *P. Vivax*, *P. malarie* e *P. ovale*. Não é efetiva contra as formas exoeritrocíticas da malária. Não tem ação contra as fases hepáticas dos parasitos, sendo eficaz contra gametócitos de *P. vivax* (GOMES, 2006). O mecanismo de ação dos quinolinometanóis não é bem conhecido, mas pode envolver: ligação direta ao grupo heme, inibição de uma ferriprotoporfirina IX polimerase não identificada (inibição de polimerização da heme), inibição de uma fosfolipase vacuolar, inibição da síntese de proteína, interação com o DNA (GOMES, 2006).

#### **1.5.1.1.3 Artemisinina e seus derivados**

O mecanismo de ação da artemisinina envolve duas etapas: na primeira ocorre a geração do radical livre e, na segunda, a alquilação de proteínas específicas e fundamentais para a sobrevivência do parasito. Esta geração de radicais livres dependeria do íon ferro, estando ele ligado ao grupo heme ou isolado. Sabe-se ainda que a artemisinina possui a propriedade de se ligar fortemente a membranas celulares. Este mecanismo também ajudaria na destruição do parasita, uma vez que, estando o fármaco ligado a estruturas responsáveis por funções vitais do mesmo, como membrana plasmática, mitocôndria e carioteca, poderia ocorrer destruição destas, o que acarretaria a morte do parasita (SILVA, 2006).

#### **1.5.1.2 Inibidores da síntese do ácido fólico**

Esses compostos inibem a síntese das bases pirimidínicas do parasita e, conseqüentemente, a síntese do DNA. Existem dois tipos de antifolatos: inibidores da diidrofolato redutase, como pirimetamina e proguanil, por exemplo, e inibidores da diidropteroato sintase, que são as sulfonas e sulfonamidas, como por exemplo, a dapsona e sulfadoxina, respectivamente. Devido ao forte efeito sinérgico, um fármaco do primeiro grupo é geralmente associado a um do segundo. Entretanto, a associação apresenta baixa efetividade contra cepas resistentes a cloroquina (SILVA, 2006).

### 1.5.1.3 Inibidores da transcrição procariótica

Estudos têm demonstrado que os parasitas da malária são suscetíveis aos antibióticos, que são inibidores da transcrição procariótica. A avaliação do efeito desses antibióticos indicou que eles são capazes de reduzir muito a taxa de parasitas após a exposição inicial; entretanto, os seus efeitos somente começam a ser obviamente observados após o primeiro ou segundo ciclo de replicação do parasita (CUNICO *et al.*, 2008).

As tetraciclinas, um grupo de agentes antibióticos, principalmente a tetraciclina e a doxiciclina, são úteis no tratamento da malária. Além disso, a clindamicina, uma lincosamida de ação antibiótica, também é recomendada. Estes agentes são esquizontocidas sanguíneos de ação lenta. Todos agem via um mecanismo de morte retardado, que inibe a transcrição de proteínas no plastídeo do parasito. Este efeito sobre os parasitos da malária se manifesta como morte da progênie dos parasitos tratados com o fármaco, levando a um aparecimento lento da atividade antimalárica (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012).

### 1.5.1.4 Inibidores do transporte de elétrons mitocondiais

O *Plasmodium* reside em meios com deficiência de oxigênio e contam com a glicose para produzir ATP. Assim, a mitocôndria não tem atividade de fosforilação oxidativa e tem uma cadeia de transporte de elétrons incompleta que promove certas reações redox de importância metabólica. Uma dessas é o acoplamento do citocromo c redutase ao diidroorotato desidrogenase, a enzima chave na biossíntese de nucleotídeos (CUNICO *et al.*, 2008).

A Atovaquona, análogo altamente lipofílico da ubiquinona, age seletivamente sobre o complexo mitocondrial citocromo bc<sub>1</sub>, de modo a inibir o transporte de elétrons e anular o potencial de membrana mitocondrial (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012).

## 1.6 PRODUTOS NATURAIS COM AÇÃO ANTIMALÁRICA

A malária, uma doença considerada negligenciada, têm assolado populações ao longo da história, com grandes perdas sociais e econômicas. Na região Amazônica, por exemplo, há uma dificuldade de alcançar, de forma simultânea, todas as áreas

para propiciar medidas de controle da malária, em virtude de fatores ambientais, epidemiológicos, sociais e econômicos já conhecidos. Nesse contexto, uma parte considerável da população faz uso de plantas medicinais como alternativa terapêutica para o tratamento dessa doença (FERREIRA, 2015).

Apesar da utilização bastante difundida de plantas medicinais no combate à malária pelas populações amazônicas, enriquecida pela vasta biodiversidade e pela miscigenação das culturas indígena e negra, muitas ainda são desconhecidas ou possuem uso restrito (COSTA, 2013). Alguns estudos de caráter etnofarmacológico relatam o uso dessas plantas e podem servir de base para pesquisas científicas da atividade terapêutica. Quando as pesquisas seguem a indicação popular, podem possibilitar o desenvolvimento de uma nova droga em um menor espaço de tempo (FUNARI; FERRO, 2005).

A descoberta de novas substâncias com propriedades antimaláricas é essencial para o tratamento da doença e as substâncias isoladas a partir de extratos de plantas representam uma importante fonte para a obtenção de protótipos candidatos a novos fármacos antimaláricos. No entanto, observa-se que há pouco incentivo para pesquisas sobre novos fármacos que possam propiciar o controle de doenças negligenciadas (FERREIRA, 2015).

Entre as plantas medicinais utilizadas popularmente para o tratamento da malária está a *Kalanchoe pinnata* (FRAUSIN *et al.*, 2015) e, no Brasil, está incluída na Relação Nacional de Plantas de Interesse ao SUS (RENISUS), que lista 71 espécies vegetais de interesse terapêutico, devido as propriedades farmacológicas a elas atribuídas.

### 1.6.1 O gênero *Kalanchoe*

Dentre as diversas plantas medicinais utilizadas na fitoterapia, destaca-se a *Kalanchoe pinnata* (Lamarck.) (*K. pinnata*), uma planta herbácea pertencente à família Crassulaceae. O gênero *Kalanchoe* compreende aproximadamente 125 espécies, muitas delas nativas do sul do continente africano (COSTA, *et al.*, 2008). Distribuída por várias regiões tropicais do mundo, *K. pinnata* apresenta um grande número de sinonímias botânicas como: *Bryophyllum pinnatum*, *Bryophyllum germinans*, *Kalanchoe daigremontiana*, *Kalanchoe fortuna*, *Kalanchoe corona*, *Kalanchoe*

*cículata*, *Kalanchoe rhizophilla*, *Cotyledon calycina*, *Crassouvia flori-pendula* e *Bryophyllum calycinum*, sendo este último o mais comum em trabalhos científicos (JAIN *et al.*, 2008; NASCIMENTO *et al.*, 2014)

No Brasil a espécie é popularmente conhecida como folha-da-fortuna, folha-de-pirarucu, coirama, courama, courama-vermelha ou saião roxo. Trata-se de uma planta herbácea ou sublenhosa, perene, carnosa e glabra, de talo simples e ereto, castanho pardo, e caules mais velhos de cor clara e os mais jovens avermelhados com máculas brancas, pouco ramificada, que atinge de 1,0 a 1,5 metros de altura. Suas folhas são opostas, suculentas, ovaladas e de margem crenada com 10 a 20 cm de comprimento. Suas flores podem medir até 5 cm de comprimento, são violáceas, pendentes em cachos. Os frutos são membranáceos e as sementes elipsoides (KAMBOJ; SALUJA, 2009; LORENZI; MATOS, 2008; NASCIMENTOS, *et al.*, 2014).

O gênero *Kalanchoe* demonstra grande valor ornamental e decorativo, seu desenvolvimento ocorre à sombra e suporta longos períodos sem água, no entanto, em períodos frios, necessita de mais calor do que a maior parte das plantas suculentas. O processo de reprodução e propagação desta espécie acontece de forma assexuada a partir do brotamento de plântulas nas margens da folha ou de partes seccionadas do vegetal (GARCÊS *et al.*, 2007).

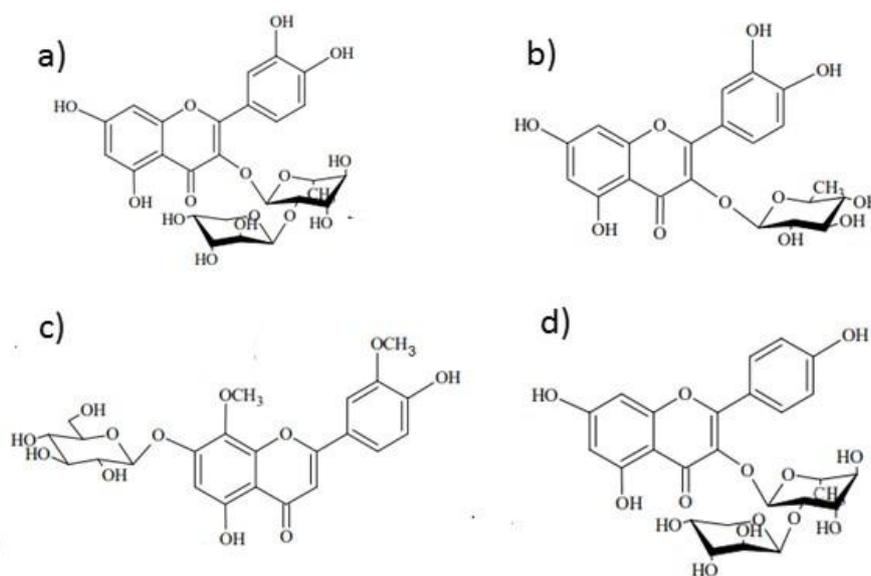
O desenvolvimento da planta pode variar de acordo com sua exposição a luz e a variação dos nutrientes presentes em diferentes substratos, o que pode influenciar no crescimento através de parâmetros como número de folhas, comprimento, rendimento de biomassa e área foliar a composição química. Um estudo de cultivo e extração de ativos da planta cultivadas sob luz solar direta apresentaram os maiores teores de flavonóides totais expressos, como rutina, que as plantas cultivadas à sombra, demonstrando a importância da radiação UV na biossíntese dos flavonóides (MUZITANO, *et al.*, 2011; PINHEIRO *et al.*, 2016). Os principais constituintes identificados em *K. pinnata* são: ácido málico, ácido cítrico, ácido isocítrico, os glicosídeos flavonoídicos e os terpenos, onde os flavonóides e terpenos apresentam atividade antiparasitária (NASCIMENTO *et al.*, 2014).

### 1.6.2 Composição química do extrato da *K. pinnata*

Quimicamente, o extrato de *K. pinnata* apresenta uma enorme diversidade de metabólitos secundários. Dentre as classes de compostos orgânicos presentes destacam-se, compostos fenólicos, entre eles ácido fenólicos, flavonóides e taninos, alcalóides, cardenolídeos, bufadienolídeos, terpenos e esteroides (OKWU e JOSIAH, 2006; KAMBOJ e SALUJA, 2009).

Segundo Muzitano e colaboradores (2006) os flavonóides representam uma classe de substâncias relevantes para espécie devido grande quantidade de composto isolados e identificados, e as diversas atividades farmacológicas promissoras. Dentre a grande variedade de compostos identificado pela literatura com interesse terapêutico estão a quercetina 3-*O*- $\alpha$ -L-arabinopiranosil (1 $\rightarrow$ 2)  $\alpha$ -L-ramnopiranosídeo (Figura 4 a), quercitrina (Figura 4 b), 4',5-di-hidroxi-3',8-dimetoxiflavona 7-*O*- $\beta$ -D-glucopiranosídeo (Figura 4 c) e kapinatosídeo (kaempferol 3-*O*- $\alpha$ -L-arabinopiranosil (1 $\rightarrow$ 2)  $\alpha$ -L-ramnopiranosídeo) (Figura 4 d) que devido a sua ocorrência restrita e sua abundância em *K. pinnata*, pode ser considerado um marcador químico para esta espécie de alto potencial terapêutico (MUZITANO *et al.*, 2006).

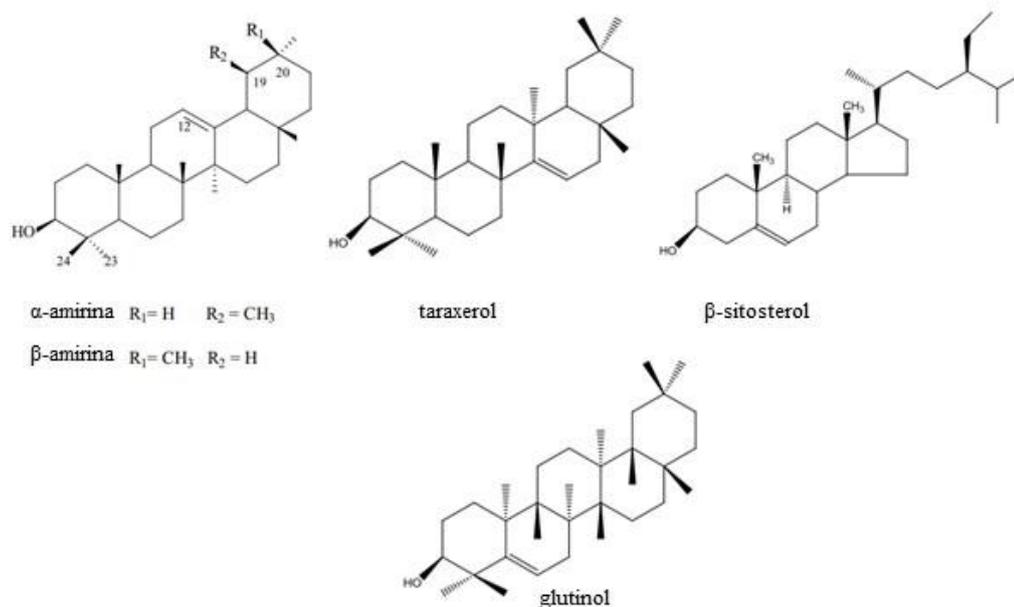
**Figura 4-** Estrutura dos principais flavonoides presentes no extrato de *K. pinnata* . a) quercetina 3-*O*- $\alpha$ -L-arabinopiranosil (1 $\rightarrow$ 2)  $\alpha$ -L-ramnopiranosídeo, b) quercitrina, c) 4',5-di-hidroxi-3',8-dimetoxiflavona 7-*O*- $\beta$ -D-glucopiranosídeo e d) kapinatosídeo (kaempferol 3-*O*- $\alpha$ -L-arabinopiranosil (1 $\rightarrow$ 2)  $\alpha$ -L-ramnopiranosídeo)



Fonte: adaptado de Gonçalves (2017)

A presença de triterpenos e esteróides é comum no gênero *Kalanchoe*, assim como para espécie *K. pinnata*, visto que, estão altamente distribuídos na planta, sendo mais recorrentes em partes aéreas do vegetal. No que diz respeito a variedade química isolada da espécie e pertencente a classe de metabólitos supracitada, compreende-se:  $\alpha$ -amirina,  $\alpha$ -aminoacetato,  $\beta$ -amirina,  $\beta$ -aminoacetato, bricofonona, bryophollone, taraxerol, pseudo-taraxasterol, 18- $\alpha$ -oleanano, glutinol, cardienolide e bufadienolideos como,  $\beta$ -sitosterol, bryophyllol, bryophynol, bricofilina A, bricofilina B, bricofilina C (com exemplos de algumas das estruturas químicas apresentadas na Figura 5), isolados das partes aéreas, os quais são altamente reativos e semelhantes em estrutura e atividade aos glicosídeos cardíacos digoxina e digitoxina (KAMBO; SALUJA, 2009; PATTEWAR *et al.*, 2012).

**Figura 5-** Estruturas químicas de alguns dos triterpenos e esteroides encontrados na *K. pinnata*



Fonte: adaptado de Araujo (2013)

### 1.6.3 Propriedades medicinais do extrato da *K. pinnata*

A espécie *K. pinnata* é popularmente utilizada para o tratamento de doenças inflamatórias, úlceras gástricas, queimaduras, diarreia, vômito, picada de insetos, dores no corpo e como agente antifúngico e antibacteriano (KAMBOJ; SALUJA, 2009). A Tabela 1 abaixo demonstra algumas atividades da *K. pinnata*.

**Tabela 1-** Atividades medicinais da *K. pinnata*

Autores	Propriedade medicinal
MATTHEW <i>et al.</i> , 2013; FERREIRA <i>et al.</i> , 2014	Atividade anti-inflamatória
MORSHED <i>et al.</i> , 2010;	Atividade antinoceptiva
NAYAK <i>et al.</i> , 2010	Atividade cicatrizante
GOMES <i>et al.</i> , 2010	Atividade antileishmania
MOHAN <i>et al.</i> , 2012; NASCIMENTO <i>et al.</i> , 2013; PHATAK e HENDRE 2014;	Atividade antioxidante
BISWAS <i>et al.</i> , 2011;	Antimicrobiana
PATIL <i>et al.</i> , 2013	Antidiabética
PATIL <i>et al.</i> , 2013	Gastroprotera, antihistamínica

A ação imunomodulara e antileishmania do extrato de *K. pinnata* foi investigada por Gomes e colaboradores (2010) utilizando o modelo de infecção em camundongos BALB/c com *Leishmania chagasi*. Neste estudo, animais que receberam doses diárias orais do extrato (400 mg/kg) por 30 dias mostraram uma carga de parasitas hepática e esplênica significativamente reduzida quando comparados com animais não tratados. A proteção foi acompanhada por uma redução nos níveis séricos de IgG específicos do parasita e diminuição da capacidade das células do baço para produzir IL-4, mas não o IFN- $\gamma$  e o óxido nítrico após a recuperação do antígeno *in vitro*. O medicamento de referência Pentostam (72 mg/kg) administrado pela via intraperitoneal em dias alternados produziu um efeito anti-leishmanial semelhante ao extrato.

Existem poucos estudos sobre a atividade gastroprotetora e prevenção de úlceras gástricas. Andesanwo *et al.* (2007) verificaram que o extrato metanólico da planta inibiu o desenvolvimento de úlcera e exerceu ação protetora da mucosa gástrica em modelo experimentais de úlcera induzida em ratos por ácido acetilsalicílico e indometacina. Além disso, estudo complementares sobre a ação antihistaminica de

flavonóides obtidos do extrato aquoso de *K. pinnata*, demonstram uma correlação entre ação antagônica da histamina e atividade gastroprotetora (CRUZ *et al.*, 2008)

Na Índia, o suco das folhas frescas da *K. pinnata* é populamente utilizada de forma muito eficaz para o tratamento da icterícia. Em 2003, Yadav e colaboradores realizaram estudo da capacidade hepatoprotetora do extrato etanólico e aquoso da folhas *K. pinnata* em ratos contra a hepatotoxicidade induzida por CCl<sub>4</sub>, demonstrando assim, grande potencial hepatoprotector como evidenciado por estudos *in vitro*, *in vivo* e histopatológicos. Em suma, plantas capazes de promover melhoras na capacidade hepática podem favorecer o tratamento sintomático de doenças que acometem o fígado ou diminuir o risco de lesões ocasionadas por medicamentos hepatotóxicos.

## 1.7 MODELOS EXPERIMENTAIS EM MALÁRIA

A análise da atividade antimalárica de novos compostos segue procedimentos padronizados, onde algumas espécies de animais como os primatas já serviram de modelos experimentais para a malária causada pelo *P. falciparum*, pois reproduzem parâmetros muito semelhantes à infecção pelo *P. falciparum* em humanos.

Os modelos experimentais com malária atualmente têm sido bastante utilizados e funcionam como uma importante ferramenta para o estudo dos mecanismos imunológicos envolvidos na proteção do hospedeiro e na patogênese da doença (LAMB *et al.*, 2006). Em animais como os camundongos, os mecanismos de ação de IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$  e IL6 são bastante similares aos de seres humanos. As citocinas atuam no sistema nervoso central e no centro de termorregulação no hipotálamo, como nas sepse em humanos, a sepse murina também apresenta como resultado a hipotermia e não a febre (SOUZA e RILEY, 2002; LAMB *et al.* 2006).

Uma das primeiras barreiras que o organismo possui é a imunidade inata, que tem a função de identificar a presença de patógenos invasores e eliminá-los o mais breve possível ou iniciar uma resposta imune adaptativa de proteção. Já foi demonstrado que a imunidade inata do hospedeiro, na malária, é ativada nas fases iniciais da infecção e que a sobrevivência do hospedeiro, está ligada a capacidade do animal em controlar a parasitemia nos primeiros 7 – 14 dias de infecção (STEVENSON *et al.* 2004).

Existem quatro espécies de parasitas de malária extraídos de roedores africanos que foram adaptadas para o crescimento em camundongos: *P. berghei*; *P. chabaudi*; *P. vinckei*; e *P. yoelii*. As características apresentadas por cada uma destas espécies de malária, são muito similares às quatro espécies de malária humana, contribuindo assim com a escolha do plasmódio de roedores de acordo com o tipo de estudo. Para avaliar a variação antigênica é utilizado com mais frequência o *P. chabaudi*, já para analisar as complicações que a malária cerebral causa são utilizadas cepas de *P. berghei* ANKA, em testes para produção de vacinas em estágio pré-eritrocíticos é utilizado o *P. yoelii* e para estudos de cronobiologia é utilizado o *P. vinckei*. A escolha para trabalhar com estes modelos de parasitas vem sendo muito utilizados devido à facilidade de manuseio e de criação de ratos e camundongos em laboratório (LI *et al.*, 2001).

Os camundongos utilizados para estudos de malária, dentre os roedores, são os mais indicados, onde cada linhagem apresenta características similares e diferentes ao mesmo tempo quando infectadas por algum plasmódio. Para estudos diversos como o entendimento de doenças metabólicas, autoimunes, fixação de complemento, tumores de mama e pulmão, além de testes de drogas e também de comportamento, a linhagem *Swiss* é a mais utilizada. Para a realização de estudos como a produção de anticorpos monoclonais e tumores mamários, a linhagem mais utilizada é a *BALB/c*, porém podem desenvolver com facilidade durante sua vida outros tipos de cânceres, são resistentes ao desenvolvimento de aterosclerose, apresentam alta incidência de calcificação cardíaca, distúrbios cardiovasculares e lesões do miocárdio, além da grande sensibilidade à radiação X. O camundongo *BLACK*, pertence a linhagem *C57Bl/6*, sendo amplamente utilizado em estudos *in vivo* nas áreas de biologia cardiovascular e do desenvolvimento e comportamento, diabetes e obesidade, genético, imunologia, neurobiologia e oncologia, são altamente susceptíveis à obesidade, diabetes tipo 2 e aterosclerose induzida por dieta, alta incidência de microftalmia e outras alterações oculares, dermatite crônica ulcerativa, e diferentemente das duas outras linhagens citadas, esta apresenta alta preferência ao álcool (LI *et al.*, 2001; QUEIROZ, 2007; HONG *et al.*, 2011).

As cepas de plasmódio quando inoculadas em camundongos podem apresentar diferentes reações. Camundongo da linhagem *C57Bl/6* quando infectado pelo *P. berghei* ANKA, pode apresentar alterações neurológicas, ataxia, paralisia

muscular, convulsões, coma e morte, similarmente observadas em humanos. Alterações metabólicas e vasculares sistêmicas e alterações na massa encefálica são alterações que podem ser observadas nesta linhagem, quadro também apresentado em humanos (QUEIROZ, 2007). A inoculação desta mesma cepa de *P. berghei* ANKA em camundongos BALB/c não é capaz de desenvolver a síndrome neurológica, apesar de apresentar alterações na massa encefálica, mas apresenta um tempo de sobrevivência maior e apresenta um quadro de anemia grave e alta parasitemia, que o leva ao óbito.

Embora nenhum modelo animal reproduza com exatidão a síndrome humana, o *P. berghei* ANKA, quando utilizado em camundongos C57BL/6 e CBA, que não são resistentes, podem apresentar um quadro neuroclínico com sinais de ataxia, convulsões e coma associados ao sequestro celular nos vasos da microcirculação, pois somente estas duas linhagens apresentam predisposição genética em expressar uma intensa resposta imune pró-inflamatória (SOUZA; RILEY, 2002).

## 2 JUSTIFICATIVA

Apesar dos avanços nas áreas da medicina, farmacoterapia e vigilância em saúde, a malária ainda apresenta um grande número de indivíduos infectados no mundo, ficando entre as principais doenças infectocontagiosas que atingem o homem. Além disso, a alta endemicidade da malária em diversas partes do mundo faz com que esta doença alcance o número expressivo de 200 milhões de notificações por ano. Apesar de constantes pesquisas sobre novos fármacos para combater a malária ainda temos um quantitativo pequeno de medicamentos antimaláricos, e o arsenal de fármacos utilizados está se tornando ineficiente frente a resistência múltipla que a espécie *Plasmodium falciparum* vem demonstrando. Tem-se noticiado a constatação de que o *Plasmodium falciparum*, responsável pelo mais mortal dos tipos de malária, está resistente à artemisinina em algumas partes do Camboja, Tailândia, Vietnã e Mianmar (países os quais possuem plantas da espécie estudada neste trabalho).

Sem uma vacina eficaz, seu controle exige um programa integrado que inclui proteção individual contra a picada dos vetores e o tratamento quimioterápico específico dos pacientes infectados. O atual arsenal terapêutico empregado no tratamento clínico da malária adota a utilização de associações medicamentosas de compostos de aminoquinolínicos sintéticos, como mefloquina e primaquina, com derivados endoperóxidos semissintéticos da artemisinina: o arteméter e o artesunato. No entanto, a elevada toxicidade dessas associações somada à crescente resistência do *Plasmodium* à terapia convencional torna urgente a busca de novas classes de quimioterápicos capazes de combater o parasito causador da doença.

Considerando a grande biodiversidade brasileira, principalmente na região Amazônica, onde muitos vegetais apresentam grande potencial terapêutico para diversas patologias, a busca por novas moléculas ou compostos com finalidade antimalárica, que por sua vez não apresentem tantos efeitos adversos e/ou até tóxicos quanto a terapêutica utilizada atualmente, bem como a contribuição para reduzir a morbidade e mortalidade atribuída à doença justifica a presente pesquisa.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antimalárica do extrato etanólico de *K. pinnata* em modelo *in vivo* de malária utilizando camundongos BALB/c infectados com *Plasmodium berghei*.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Caracterizar os principais componentes químicos do extrato da *K. pinnata*;
- b) Avaliar a toxicidade aguda da *K. pinnata* em camundongos BALB/c;
- c) Analisar o tempo de sobrevivência dos animais infectados pelo *P. berghei* após o tratamento com as diferentes doses de *K. pinnata*
- d) Verificar a eficácia da *K. pinnata* na redução dos níveis da parasitemia em camundongos infectados com *P. berghei*;
- e) Correlacionar os níveis de glicose plasmática com a parasitemia nos grupos não tratados e tratados com a *K. pinnata*.
- f) Avaliar os parâmetros hematológicos dos animais com malária, infectados pelo *P. berghei* tratados e não tratados com a *K. pinnata*;
- g) Avaliar a função hepática nos grupos não tratados e tratados com a *K. pinnata*.
- h) Avaliar a função renal a nos grupos não tratados e tratados com a *K. pinnata*.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 COLETA DA PLANTA E PREPARAÇÃO DO EXTRATO DA *K. pinnata*

A *K. pinnata* foi coletada no decorrer dos anos de 2017 e 2018, na área urbana do município de Santarém-PA nos bairros do Maracanã (2°26'27.2"S e 54°44'36.0"W) e Conquista (2°27'02.5"S e 54°45'13.4"W). O material foi botanicamente identificado e uma exsicata encontra-se depositada no Herbário da Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA) sob registro nº 00062. As folhas foram submetidas a limpeza superficial para remoção de impurezas como terra, poeira, e outras sujidades e posteriormente levadas a estufa à temperatura de 40°C para secagem no período de 20 a 30 dias, até estabelecimento da massa constante.

O material vegetal seco foi moído e macerado com álcool etílico 95% (na razão de 10 mg/mL) durante sete dias, a temperatura ambiente, ao abrigo da luz, com agitação ocasional para homogeneizar e proporcionar melhor contato do solvente com o material vegetal. Após a maceração, a solução extrativa foi filtrada em papel filtro e evaporada em rotaevaporador, obtendo-se um extrato seco. Para as aplicações posteriores nos animais, o extrato foi diluído em Tween 80 a 4%.

### 4.2 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DO EXTRATO DA *K. pinnata*

Para a análise cromatográfica foi utilizado o método de análise por gradiente exploratório, via HPLC (arranjo de diodos) Agilent Technologies 6890 N (EUA) com detecção por absorção no ultravioleta UV visível. Para análise cromatográfica utilizou-se uma alíquota de 20 microlitros na concentração de 10 mg/mL de extrato hidroalcolico da *K. pinnata* (preparado a partir do extrato seco obtido na etapa anterior) utilizando as seguintes condições cromatográficas: como fase estacionária utilizou-se uma coluna RP-C18 Gemini®, fase reversa, (250 mm x 4.6 mm x 5 µ) com pré coluna acoplada e como fase móvel a composição por solvente A= água e solvente B = acetonitrila variando o solvente B de 5 a 100% em 60 minutos e vazão de 1mL/min, caracterizando em modo de eluição gradiente com comprimentos de onda em 254, 280 e 360 nm.

#### 4.3 ANÁLISE QUANTITATIVA DE COMPOSTOS FENÓLICOS NO EXTRATO *K. pinnata*

Para análise quantitativa do teor de compostos fenólicos (flavonoides) no extrato de *K. pinnata* foi necessária a construção de uma curva de calibração utilizando a rutina como padrão, sendo realizadas leituras espectrofotométricas em comprimento de onda de 350 nm de absorvância da solução padrão em concentrações de 2,0; 4,0; 8,0; 10,0; 20,0; 40,0 e 60,0 µg/mL (Figuras 5 e 6). Os testes foram realizados em triplicata e o espectrofotômetro utilizado foi o modelo LGI-VS-721N da marca LGI SCIENTIFIC (São Paulo, Brasil). O preparo das soluções foi através da solução mãe de rutina e do extrato etanólico de *K. pinnata*, utilizando cloreto de alumínio a 2% (p/V) em metanol como solvente. Uma alíquota do extrato da planta foi dissolvida em metanol para obter-se a concentração de 0,540 g em 100 mL correspondente a concentração do extrato (PINHEIRO *et al.*, 2016)

#### 4.4 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos da linhagem BALB/c provenientes do Biotério da Fundação Esperança/IESPES em parceria com a Universidade Federal do Oeste do Pará. Os animais foram mantidos no alojamento de animais do Laboratório de Farmacologia/ISCO/UFOPA, a uma temperatura controlada de 22±2 °C, com um ciclo claro-escuro de 12 horas, com ração balanceada (Labina®) e água a vontade e, durante 15 dias, para adaptação do alojamento e posterior a este período os animais foram separados em grupos experimentais. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Oeste do Pará sob protocolo 02001/2015.

#### 4.5 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA

O teste de toxicidade aguda, seguiu as diretrizes da *The Organization for Economic Co-operation and Development* (OECD) OCDE-423/2001 (OECD, 2001) que consiste em ensaios para a classificação de toxicidade de substâncias em teste utilizando camundongos ou ratos, preferencialmente fêmeas devido sua maior sensibilidade em relação aos machos. O protocolo estabelece que o teste se inicie

com três animais, e que se até um (1) animal vier ao óbito, o teste deverá ser repetido, porém se dois (2) ou três (3) animais forem ao óbito, o teste deverá ser interrompido, e a dose será considerada tóxica. O método é capaz de classificar as substâncias, semelhantes a outros métodos, como o método que estabelece a DL-50, e se baseia na avaliação biométrica com doses fixas para a classificação e riscos no qual o indivíduo será submetido ao receber a substância em estudo.

Este método consiste na administração via oral do extrato por cânula acoplada a seringa com o extrato da *K. pinnata* diluído em Tween 80 a 4% e veiculado em tampão fosfato-salino (PBS), em doses únicas de 5 mg/kg, 50 mg/kg, 300 mg/kg e 2000 mg/kg de massa do animal, inicialmente em grupos de 3 indivíduos, e dependendo dos efeitos adversos e da quantidade de indivíduos que apresentar tais efeitos, será determinado a continuidade dos experimentos.

Segundo o protocolo OCDE-423/2001, quando há estudos com informações sobre doses com possíveis efeitos tóxicos, os protocolos podem ser seguidos a partir da dose máxima sem efeito colateral. Como não foi encontrado na literatura nenhuma referência comprovando que a dose de 2000 mg/kg de peso corporal da *K. pinnata* não produz toxicidade em camundongos ou ratos conforme recomendação do protocolo OCDE-423/2001, por razão de proteção aos animais, utilizou-se a dose inicial, assim foi realizado o teste de toxicidade aguda da *K. pinnata* a partir da menor dose de 5 mg/kg, em seguida de 50 mg/kg, após 300 mg/kg e por último 2000 mg/kg, onde foram utilizados no total 24 camundongos da linhagem BALB/c divididos em quatro (4) grupos com três animais em cada grupo e no dia posterior foi realizado duplicata com os mesmos grupos utilizando em ambos as dosagens mencionadas acima. Após a administração da dose do extrato, os animais foram observados individualmente pelo menos uma vez a cada 30 minutos nas quatro primeiras horas, periodicamente durante as primeiras 24 horas, e diariamente a partir de então até um total de 14 dias. Os parâmetros que foram observados, com possíveis reações tóxicas, foram alterações na pele, pelos, olhos e mucosas, sinais de tremores, salivação, letargia, sono, além do tempo de início e duração do período de recuperação.

#### 4.6 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Foi realizado o tratamento com extrato da *K. pinnata*, em 3 doses diferentes definidas de acordo com o teste de toxicidade aguda estabelecido por Sachetti *et al.*

(2009). Assim ficou definido que as doses deste estudo correspondem a 1/10, 1/100 e 1/200 da dose considerada segura que é de 2000 mg/kg de *K. pinnata*. Para avaliação da atividade antimalárica, foi utilizado como droga padrão a Artemisinina (100 mg/kg).

Os animais foram divididos em seis grupos experimentais.

**Primeiro grupo:** Grupo Controle, os animais não foram infectados, mas recebem estímulo de tratamento com veículo, o PBS (Solução tampão Fosfato Salino). Este grupo serviu como parâmetro normal de referência para as análises hematológicas e bioquímicas realizadas.

**Segundo grupo:** Grupo Malária, os animais foram infectados com o *P. berghei*, onde estes animais receberam somente o estímulo de tratamento com veículo PBS. Este grupo serviu para análise das alterações que a malária pode provocar em animais infectados sem tratamento.

**Terceiro grupo:** Grupo Artemisinina (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA), os animais foram infectados com o *P. berghei* e receberam o tratamento com a Artemisinina 100 mg/kg/dia por via oral. A Artemisinina é uma das drogas utilizadas no tratamento da malária em humanos e este grupo serviu de comparativo com os grupos de tratamento com o extrato de *K. pinnata*.

**Quarto grupo:** os animais foram infectados com o *P. berghei* e também foram tratados com o extrato da *K. pinnata*, 200 mg/kg/dia;

**Quinto grupo:** os animais foram infectados com o *P. berghei* e também foram tratados com o extrato da *K. pinnata*, 100 mg/kg/dia;

**Sexto grupo:** os animais foram infectados com o *P. berghei* e também foram tratados com o extrato da *K. pinnata*, 10 mg/kg/dia.

O extrato foi solubilizado em DMSO a 4% e veiculado em PBS, administrados por via oral.

Todos os tratamentos foram iniciados no 4º dia após a inoculação do plasmódio. Este período é necessário para que o animal apresente nível parasitário adequado para manifestação da doença. Neste dia foi realizada a primeira verificação da densidade parasitária para confirmação da infecção. Para a coleta de material

biológico ao final do tratamento, os animais foram mantidos sob a dieta rotineira, não realizando o jejum habitual, pela fragilidade do estado malárico.

#### 4.7 MANUTENÇÃO DA CEPA DE *Plasmodium berghei*

Inicialmente foi retirada de uma fêmea infectada uma amostra de sangue da porção terminal da cauda. Uma alíquota de 20  $\mu\text{L}$  de sangue total foi diluída em solução de PBS, para um volume final de 1000  $\mu\text{L}$ . Desta solução, 100  $\mu\text{L}$  foram administrados por via intraperitoneal nos animais de repasse, sendo este procedimento repetido semanalmente para a infecção de novos animais e garantia de manutenção *in vivo* da cepa.

#### 4.8 INDUÇÃO DO MODELO EXPERIMENTAL

Para induzir o modelo de malária, foi utilizada a cepa ANKA de *Plasmodium berghei* (PbA). Uma amostra da cepa foi gentilmente cedida pela professora Dra. Karen Renata de Oliveira, do Laboratório de Neurofarmacologia da Universidade Federal do Pará.

Para realizar a inoculação dos grupos experimentais, o animal infectado primariamente e doador, teve uma gota de sangue da porção terminal da cauda coletada para análise da densidade parasitária. Os animais que apresentaram uma densidade maior que 10% na fase de ascensão tiveram o conteúdo sanguíneo coletado através da punção cardíaca.

A coleta por punção cardíaca foi realizada com o auxílio de seringa de insulina lavada com EDTA, sendo o agente anticoagulante. Para garantir o grau de parasitemia uniforme nos diferentes grupos experimentais, os animais foram infectados por via intraperitoneal com o inóculo padronizado de aproximadamente  $10^6$  eritrócitos parasitados em 100  $\mu\text{L}$  de PBS.

#### 4.9 DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE PARASITÁRIA E SUPRESSÃO PARASITÊMICA

Para a determinação da parasitemia, foram realizadas as pesquisas de parasitas através de distensões com o sangue obtido da cauda dos camundongos fixado em

metanol absoluto (P.A.) durante 2 minutos e posteriormente corado com solução de Giemsa (10%) por 15 minutos.

A porcentagem de parasitemia (% parasitemia) de cada animal foi determinada pela razão entre a quantidade de eritrócitos parasitados e quantidade total de células (500 células por esfregaço).

$$\% \text{ parasitemia} = \frac{\text{número de eritrócitos parasitados}}{500} \cdot 100$$

A determinação da parasitemia se deu no 4º, 7º e 11º dias pós inoculação dos camundongos BALB/c com a cepa PbA.

Para determinar a potencial supressão (% supressão) do extrato sobre o índice de parasitemia nos camundongos infectados com *P. berghei*, foi seguido o modelo de cálculo proposto por Girma *et al.* (2015), onde:

$$\% \text{ supressão} = \frac{\text{parasitemia do controle negativo} - \text{parasitemia do grupo tratado}}{\text{parasitemia do controle negativo}} \cdot 100$$

#### 4.10 ANÁLISE DE SOBREVIDA PÓS-TRATAMENTO COM O EXTRATO DE *K. pinnata*

Em cada grupo experimental foram escolhidos aleatoriamente dois animais para análise de sobrevivência após a inoculação do *Plasmodium* e tratamento com a *K. pinnata*. Os animais foram mantidos a uma temperatura controlada de 22±2 °C, sobre um ciclo claro-escuro de 12 horas, com ração balanceada (Labina®) e água liberada, até o óbito naturalmente.

#### 4.11 DETERMINAÇÃO DA GLICOSE PLASMÁTICA

A determinação da concentração de glicose no plasma no 11º dia foi realizada através do método enzimático-colorimétrico da glicose-oxidase, usando kit LabTest® adquiridos comercialmente, com leitura realizada em Analisador

Bioquímico semi-automático Thermoplat®. Os resultados são expressos em mg/dL e comparados com valores dos grupos controle.

#### 4.12 PARÂMETROS DE FUNÇÃO HEPÁTICA

Ao final do período de tratamento os animais foram submetidos a avaliação dos parâmetros de função hepática, com análise da atividade das enzimas Alanina Aminotransferase (AST) e Aspartato Aminotransferase (ALT).

A atividade das transaminases foi determinada através do plasma utilizando kit LabTest® por método cinético-colorimétrico adquiridos comercialmente, com leitura realizada no Analisador Bioquímico semi-automático Thermoplat®. Os resultados foram expressos como U/L e comparados com valores dos grupos controle.

#### 4.13 PARÂMETROS DE FUNÇÃO RENAL

O sangue foi coletado ao final do tratamento e utilizado para determinar os níveis de Creatinina Plasmática e de Uréia Plasmática. A determinação dos níveis plasmáticos de Creatinina e Uréia foi feita pelo método enzimático-colorimétrico, com kit LabTest® adquiridos comercialmente, com leitura realizada em Analisador Bioquímico semi-automático Thermoplat®, os resultados são expressos em mg/dL e U/L respectivamente.

#### 4.14 PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS

Para análise hematológica foi realizado um hemograma ao final do tratamento onde foram avaliados os seguintes parâmetros da série vermelha: Contagem Total de Eritrócitos, Quantificação de Hemoglobina, Determinação do Hematócrito, a Concentração de Hemoglobina Média (HCM), a Concentração Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM) e também a contagem total de plaquetas; e da série branca: Número absoluto de Leucócitos, Quantitativo de Linfócitos e Monócitos e o Quantitativo de Neutrófilos (Segmentados).

Para realização do hemograma foi utilizado um Analisador Hematológico Mindray, modelo BC2800 veterinário.

#### 4.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram armazenados e analisados estatisticamente utilizando-se o programa Graph Pad Software, San Diego, CA Prism 5.0<sup>®</sup>. Os resultados são expressos de modo quantitativo e submetidos ao teste estatístico ANOVA seguido do teste Tukey, sendo a probabilidade aceita como indicativa da existência de diferença significativa sendo de  $*p \leq 0,05$ ;  $**p \leq 0,01$ ;  $***p \leq 0,001$ .

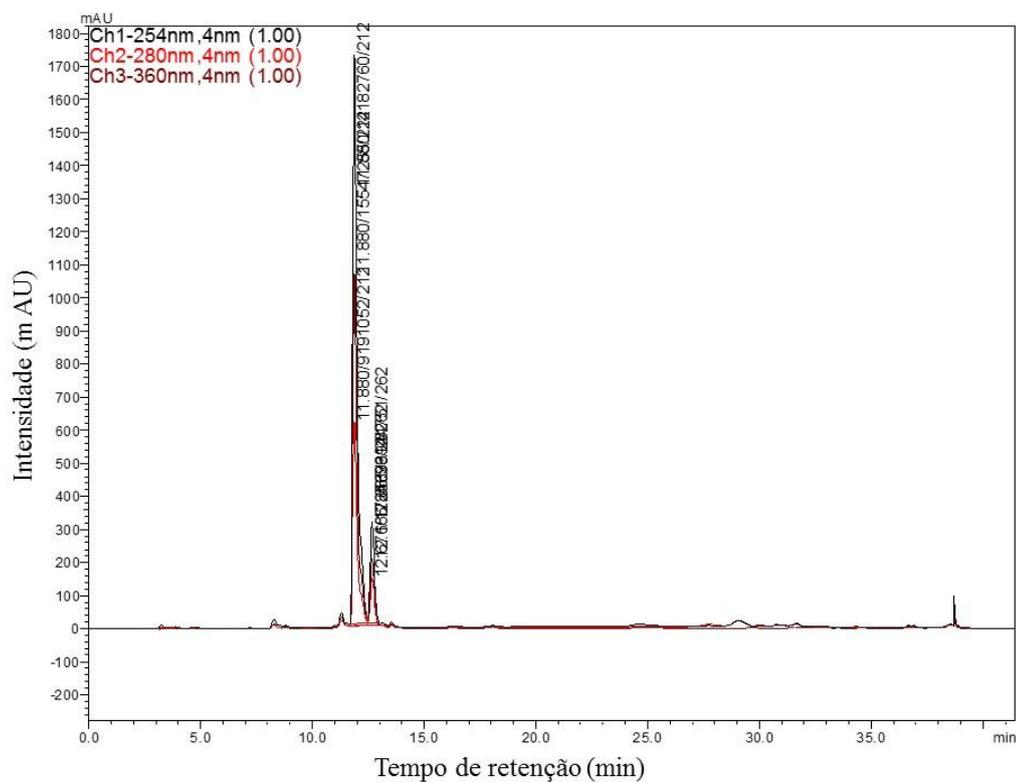
## 5 RESULTADOS

### 5.1 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DO EXTRATO DA *K. pinnata*

O extrato etanólico de *K. pinnata* obtido após a evaporação do solvente apresentou rendimento de 39% (3,9 g de extrato/g de folhas secas). A caracterização química dos compostos presentes no extrato da planta foi realizada e o cromatograma inicial em 254, 280 e 360 nm está representado na Figura 6. Já na Figura 7 observa-se a ampliação do cromatograma entre os tempos de retenção de 10 até 15 minutos em 254, 280 e 360 nm visando a melhor observação dos picos de maior intensidade, e o espectro correspondente de UV-Vis está detalhado na Figura 8.

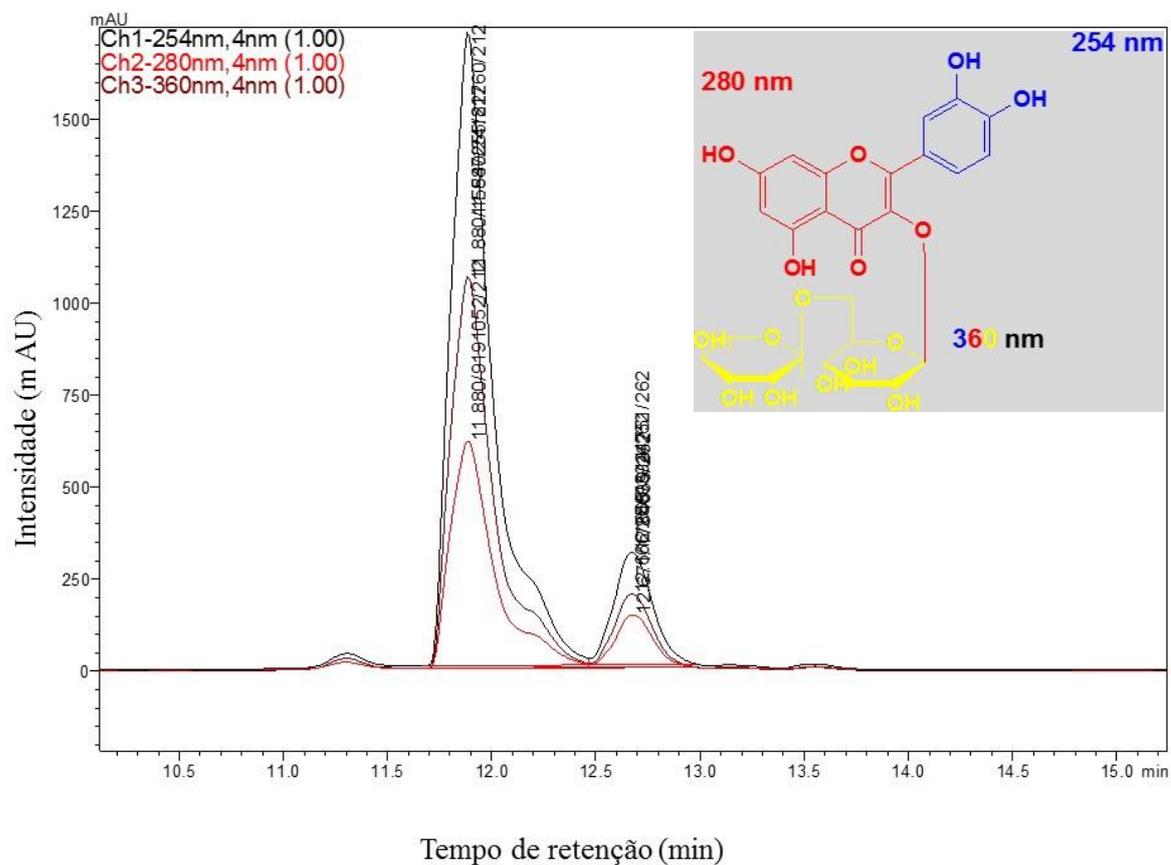
A avaliação do teor de compostos fenólicos utilizando como padrão de referência a rutina, levou a obtenção da curva de calibração  $ABS (nm) = 0,0163 \text{ Conc.}(\mu\text{g/mL}) + 0,0215$ , com  $R^2=0,9986$ , apresentada na Figura 9, indicando um bom modelo estatístico e ajustável para se determinar a concentração de flavonoides totais expresso como rutina no extrato. A concentração de flavonoides totais no extrato hidroalcólico de *K. pinnata* foi de 4,11%.

**Figura 6-** Cromatograma do extrato etanólico com concentração 10 mg/mL obtida a partir das folhas de *K. pinnata*.



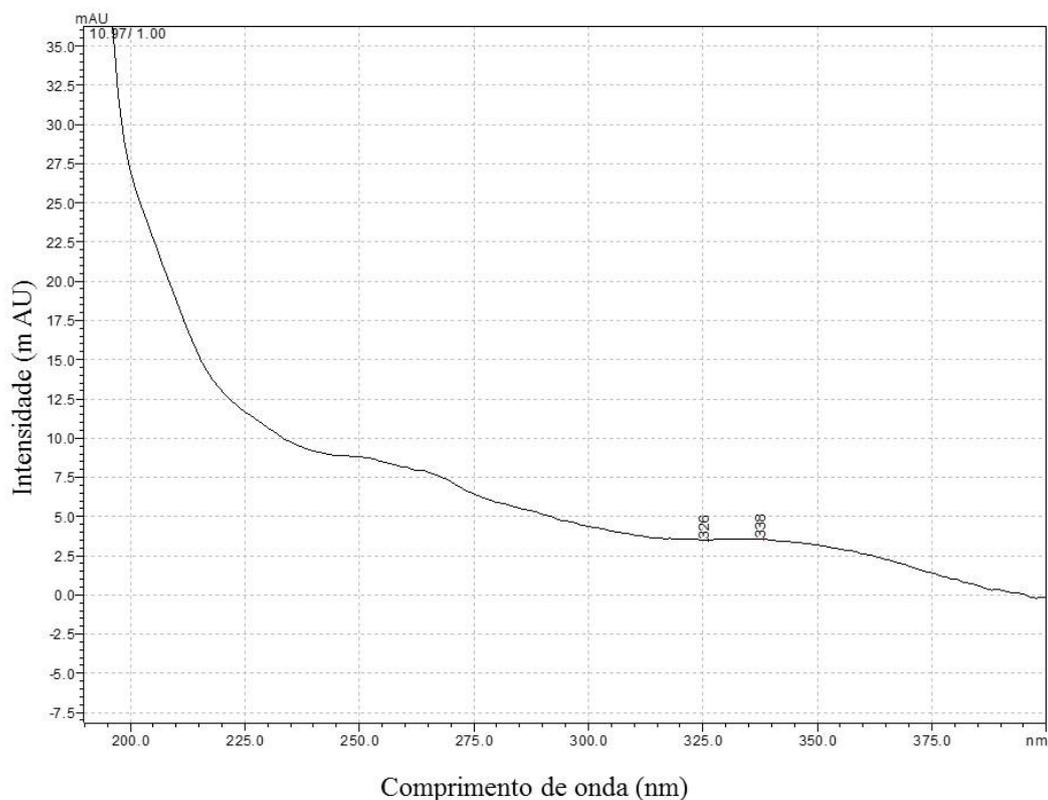
Condições cromatográficas: coluna RP-C18 Gemini® (250mm x 4.6mm x 5 $\mu$ ) com pré coluna aclopada e como fase móvel a composição por solvente A= Água e solvente B = acetonitrila variando o solvente B de 5 a 100% em 60 minutos e vazão de 1ml/min caracterizando em modo de eluição gradiente com detector de fotodiodos com comprimentos de onda em 254, 280 e 360 nm.

**Figura 7-** Cromatograma por corrida isocrática do extrato etanólico com concentração 10 mg/mL obtida a partir das folhas de *K. pinnata*.

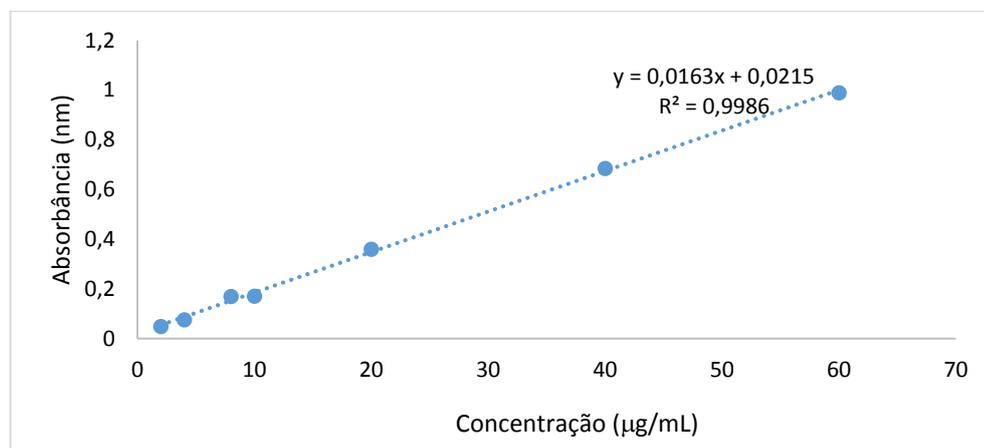


Condições cromatográficas coluna RP-C18 Gemini® (250mm x 4.6mm x 5µ) com pré coluna aclopada e como fase móvel a composição por solvente A= Água e solvente B = acetonitrila variando o solvente B de 5 a 100% em 60 minutos e vazão de 1ml/min., caracterizando em modo de eluição gradiente com detector de fotodiodos com comprimentos de onda em 254, 280 e 360 nm

**Figura 8-** Espectro de UV-Vis pertencente ao pico majoritário do extrato etanólico da *K. pinnata*.



**Figura 9-** Curva de calibração a partir de flavonoides totais expresso como rutina



## 5.2 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA

A administração das doses do extrato da *K. pinnata* de 5 mg/kg, 50 mg/kg, 300 mg/kg e 2000 mg/kg foi realizada em animais não contaminados para determinação da toxicidade aguda do extrato em estudo.

Foi observado que a administração do extrato não promoveu alterações como perda de pêlos ou na coloração dos mesmos, assim como tremores, aumento de salivação, diarreia, letargia, aumento ou diminuição do sono, sinais de dor ou sofrimento, além de não promover a diminuição da massa corporal, como pode ser observado nas Tabelas 2, 3, 4 e 5, quando os animais em teste foram comparados aos animais do grupo controle.

Com base nos critérios de classificação estabelecidos pelo protocolo, no qual não houve morte e nenhum animal apresentou sinais de toxicidade na dose de 2.000 mg/kg, permite-se classificar o extrato da *K. pinnata* com baixo grau de toxicidade aguda, com dose tóxica superior a 2.000 mg/kg. Assim determinou-se as doses correspondentes à 1/200, 1/100 e 1/10, equivalente a 10, 100 e 200 mg/kg respectivamente, para serem testadas na avaliação da atividade antimalárica.

**Tabela 2-** Análise da média (n=3) da massa corporal (gramas  $\pm$  desvio padrão) de camundongos BALB/c tratados com extrato de *K. pinnata* na dose de 5 mg/kg.

Teste	Repetição			
	Controle	5 mg/kg	Controle	5 mg/kg
Dia 0	22,3 $\pm$ 1,5	23,0 $\pm$ 1	23,3 $\pm$ 0,6	22,3 $\pm$ 2,5
Dia 7	26,3 $\pm$ 1,2	24,3 $\pm$ 1	25,3 $\pm$ 0,6	24,7 $\pm$ 2,0
Dia 14	27,6 $\pm$ 1,2	25,6 $\pm$ 1,2	26,7 $\pm$ 0,6	25,3 $\pm$ 2,5

**Tabela 3-** Análise da Média (n=3) da massa corporal (gramas  $\pm$  desvio padrão) de camundongos BALB/c tratados com extrato de *K. pinnata* na dose de 50 mg/kg.

Teste	Repetição			
	Controle	50 mg/kg	Controle	50 mg/kg
Dia 0	22,3 $\pm$ 1,5	23,0 $\pm$ 0,6	23,3 $\pm$ 0,6	21,7 $\pm$ 2,3
Dia 7	26,3 $\pm$ 1,2	26,6 $\pm$ 2,5	25,3 $\pm$ 0,6	24,0 $\pm$ 2,6
Dia 14	27,6 $\pm$ 1,2	27,6 $\pm$ 2,5	26,7 $\pm$ 0,6	25,0 $\pm$ 3

**Tabela 4-** Análise da média (n=3) da massa corporal (gramas  $\pm$  desvio padrão) de camundongos BALB/c tratados com extrato de *K. pinnata* na dose de 300 mg/kg.

Teste	Repetição			
	Controle	300 mg/kg	Controle	300 mg/kg
Dia 0	22,3 $\pm$ 1,5	22,7 $\pm$ 2	23,3 $\pm$ 0,6	20,7 $\pm$ 0,6
Dia 7	26,3 $\pm$ 1,2	26 $\pm$ 2,6	25,3 $\pm$ 0,6	22,3 $\pm$ 1,5
Dia 14	27,6 $\pm$ 1,2	27,3 $\pm$ 2,0	26,7 $\pm$ 0,6	24,7 $\pm$ 0,6

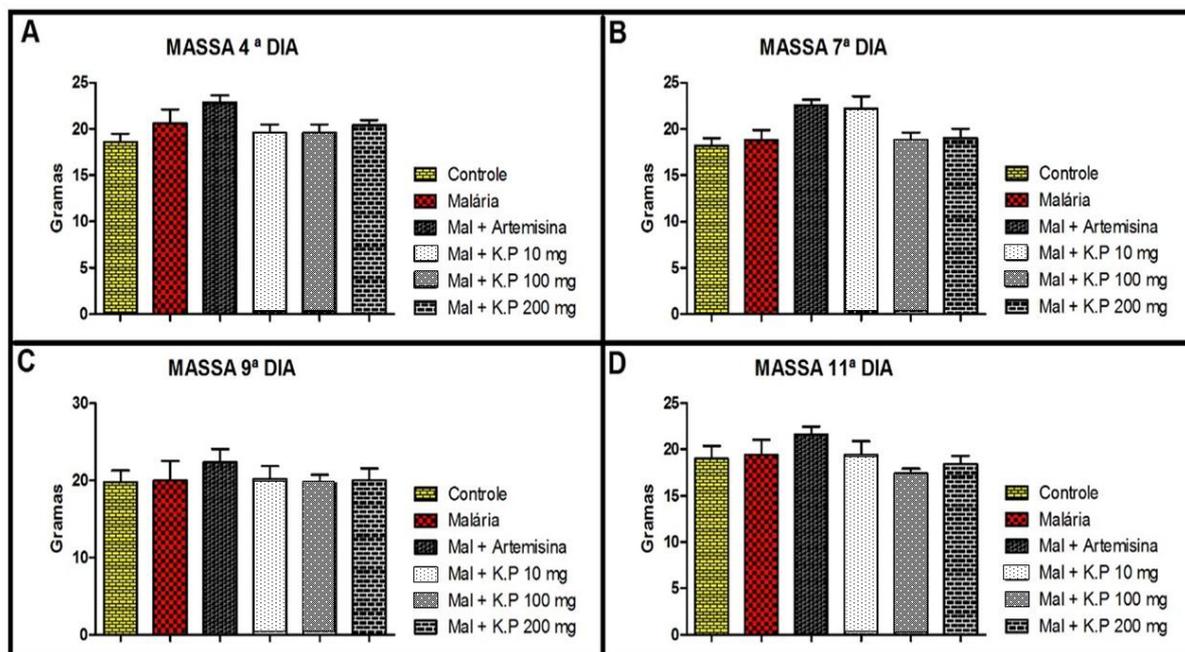
**Tabela 5-** Análise da média (n=3) da massa corporal (gramas  $\pm$  desvio padrão) de camundongos BALB/c tratados com extrato de *K. pinnata* na dose de 2000 mg/kg.

Teste	Repetição			
	Controle	2000 mg/kg	Controle	2000 mg/kg
Dia 0	22,3 $\pm$ 1,5	26,0 $\pm$ 1,5	23,3 $\pm$ 0,6	21,7 $\pm$ 0,6
Dia 7	26,3 $\pm$ 1,2	27,3 $\pm$ 2,3	25,3 $\pm$ 0,6	26,0 $\pm$ 2,6
Dia 14	27,6 $\pm$ 1,2	28,6 $\pm$ 2,0	26,7 $\pm$ 0,6	28,7 $\pm$ 1,5

### 5.3 AVALIAÇÃO DA MASSA CORPORAL NOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

A Figura 10 apresenta a análise da média da massa corporal de todos os grupos de camundongos BALB/c avaliados no planejamento experimental, ou seja, os animais infectados com *P. berguei* não tratados (Malária), assim como os contaminados e tratados com extrato de *K. pinnata* na dose de 10 mg/kg, 100 mg/kg e 200 mg/kg (Mal + K.P 10 mg, Mal + K.P 100 mg e Mal + K.P 200 mg, respectivamente), os contaminados e tratados com Artemisinina (Mal + Artemisinina) e o grupo controle, nos períodos do 4º, 7º, 9º e 11º dia.

**Figura 10-** Variação da massa corporal dos grupos estudados no A) 4<sup>o</sup>, B) 7<sup>o</sup>, C) 9<sup>o</sup> e D) 11<sup>o</sup> dias. Cada barra representa a massa, expressa em gramas, dos animais após a inoculação do *Plasmodium berghei*, nos grupos experimentais G2 Malária, G3 Artemisinina, G4 *K. pinnata* 200 mg, G5 *K. pinnata* 100 mg e G6 *K. pinnata* 10 mg.



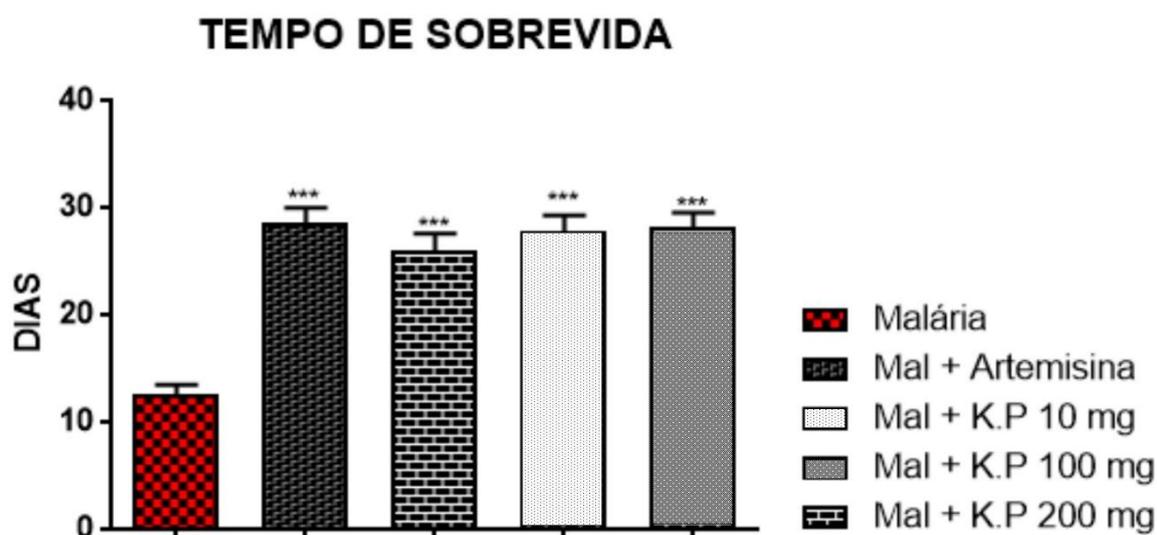
De forma geral, o grupo controle apresentou massa corporal similar aos demais grupos. No 4<sup>o</sup>, 7<sup>o</sup> e 11<sup>o</sup> dia o grupo Mal + Artemisinina apresentou uma tendência a maior massa corporal em relação aos grupos controle e malária. Já para os grupos contaminados com o protozoário da malária e tratados com *K. pinnata*, não se observa nenhuma tendência a diferenças nas massas registradas.

#### 5.4 TEMPO DE SOBREVIDA DOS ANIMAIS INFECTADOS PELO *P. berguei* APÓS O TRATAMENTO COM AS DIFERENTES DOSES DE *K. pinnata*

Pode-se observar que o grupo contaminado e não tratado apresentou tempo de sobrevivência médio de 12,6 dias, enquanto que para o grupo controle positivo, tratado com artemisina, foi de 28,6 dias. Já os grupos tratados com *K. pinnata* nas doses de 10, 100 e 200 mg/kg de massa corporal apresentaram tempo de sobrevivência médio de, respectivamente, 26, 27,8 e 28,2 dias, indicando assim a eficiência do tratamento com o extrato em questão para a contaminação por *P. berguei*.

A Figura 11 apresenta o tempo de sobrevivência dos animais estudados, contaminados com malária e tratados com artemisinina e *K. pinnata* em diferentes dosagens.

**Figura 11-** Tempo de sobrevivência dos animais. Cada barra representa o tempo, expresso em dias, de sobrevivência dos animais após a inoculação do *P. berghei*, nos grupos experimentais G2 Malária, G3 Artemisinina, G4 *K. pinnata* 200 mg, G5 *K. pinnata* 100 mg e G6 *K. pinnata* 10 mg. \*\*\* Representa que houve uma diferença significativa ( $p < 0,001$ ) no tempo de vida dos animais dos grupos tratados com Artemisinina 100 mg, *K. pinnata* 200 mg, *K. pinnata* 100 mg e *K. pinnata* 10 mg quando comparados ao grupo Malária (ANOVA, seguido do teste Tukey).

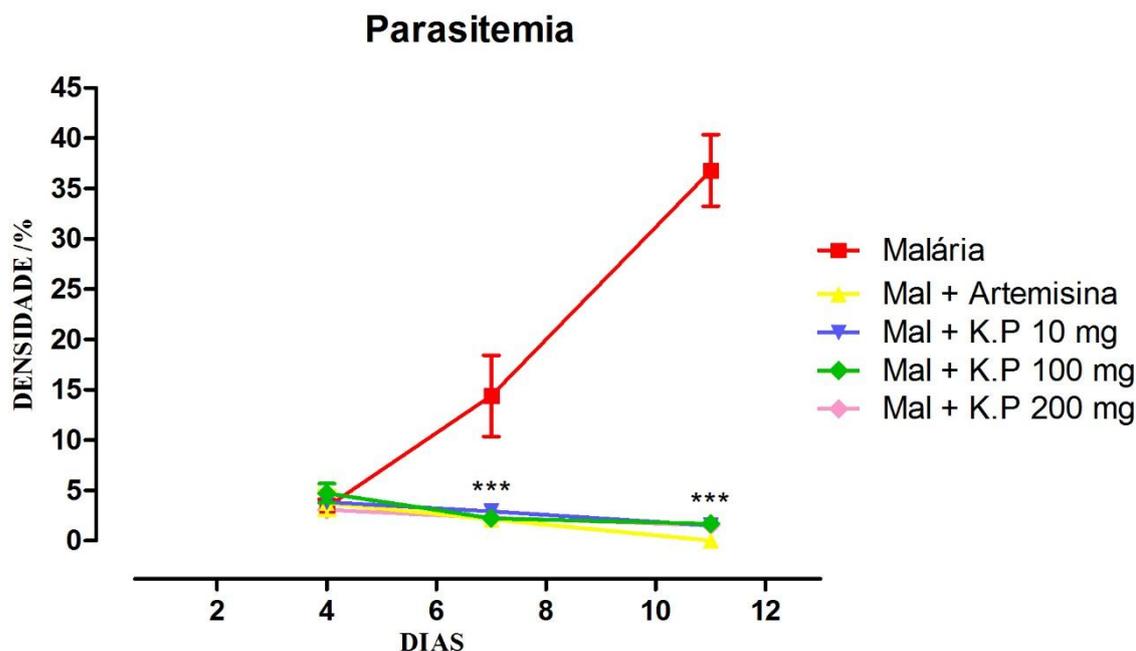


## 5.5 DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE PARASITÁRIA E SUPRESSÃO SISTÊMICA

A avaliação quantitativa do número de parasitas presentes no sangue durante os dias 7 e 11 após a inoculação demonstraram diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,001$ ) pelo teste de Tukey na porcentagem das médias da densidade parasitária do grupo G3 a G6 em relação ao grupo G2.

A Figura 12 mostra o impacto do extrato de *K. pinnata* na parasitemia da malária em animais experimentais quando administrado e comparado com o grupo de controle negativo que foi administrado o placebo, sem extrato, e o grupo controle positivo, onde foi administrada a artemisinina.

**Figura 12-** Evolução da parasitemia. Cada ponto representa a média  $\pm$  da densidade parasitária de animais pertencentes ao grupo G2 malária (infectados com *Plasmodium berghei*), G3 Mal + artemisinina (tratados com artemisinina 100 mg/kg/dia), G4-G6 Mal + K.P 10 mg, Mal + K.P 100 mg e Mal + K.P 200 mg (Tratamento com o extrato da *K. pinnata* 10, 100 e 200 mg/kg/dia respectivamente). N=10 números de animais por grupo. \*\*\* Representa a diferença ( $p < 0,05$ ) da densidade parasitária do grupo (Malária) em relação aos grupos (Mal + Artemisinina), (Mal + K.P 10 mg, Mal + K.P 100 mg e Mal + K.P 200 mg, respectivamente).



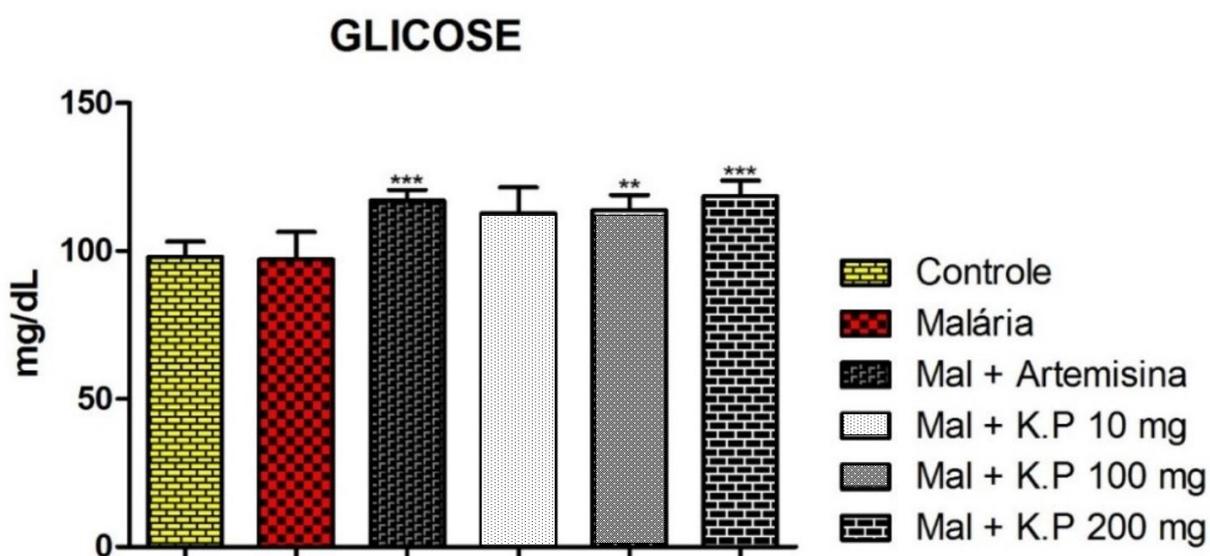
Em todas as concentrações do extrato administrado (10, 100 e 200 mg/g de massa corporal), a diferença em relação ao controle negativo nos dias 7 e 11 foram significativas ao nível  $p < 0,001$ . Não houve diferença significativa na parasitemia da malária em relação ao controle positivo. A análise dos dados obtidos após o tratamento com extrato mostrou redução significativa na densidade dos parasitas da malária quando a densidade foi comparada com as densidades de malária no grupo controle negativo. Estes resultados demonstram que a parasitemia sanguínea foi reduzida em todos os grupos tratados em comparação ao grupo que somente foi infectado com *Plasmodium berguei*, indicando assim a potencialidade do extrato de *K. pinnata* em relação ao protozoário em estudo ser equivalente a artemisinina, droga de reconhecida ação anti-malárica. A supressão da parasitemia nos grupos tratados com a *K. pinnata* no 7º dia, nas doses 10 mg, 100 mg e 200 mg foi de 79,70 %, 84,60 %, 84,7 % respectivamente. O tratamento com a Artemisinina 100 mg promoveu uma

supressão de 85,10 %. A supressão da parasitemia nos grupos tratados com a *K. pinnata* no 11º dia, nas doses 10 mg, 100 mg e 200 mg foi de 95,40%, 95,40,60%, 95,40% respectivamente. O tratamento com a Artemisinina 100 mg promoveu uma supressão de 100%.

## 5.6 AVALIAÇÃO DA GLICOSE PLASMÁTICA

A Figura 13 demonstra os níveis de glicose sanguínea no 11º dia de tratamento. Os grupos tratados apresentaram glicemia superior quando comparados ao grupo malária. No entanto, somente os grupos tratados com artemisinina e *K. pinnata* nas doses de 100 e 200 mg apresentaram resultados estatisticamente significativos quando comparados ao grupo malária, demonstrando que a tratamento com extrato da planta apresenta eficácia terapêutica semelhante a terapia convencional.

**Figura 13-** Avaliação dos níveis séricos de glicose sanguínea. Cada barra representa média + Desvio padrão dos níveis de glicose em mg/dL dos animais analisados no 11º dia de tratamento após a inoculação do *P. berghei*, nos grupos experimentais G2 Malária, G3 Artemisinina, G4 *K. pinnata* 200 mg, G5 *K. pinnata* 100 mg e G6 *K. pinnata* 10 mg. \*\*\* Representa que houve uma diferença significativa ( $p < 0,001$ ) e \*\* diferença significativa ( $p < 0,01$ ) nos níveis de glicose dos animais dos grupos tratados com Artemisinina 100 mg, *K. pinnata* 200 mg, *K. pinnata* 100 mg e *K. pinnata* 10 mg quando comparados ao grupo Malária (ANOVA, seguido do teste Tukey).

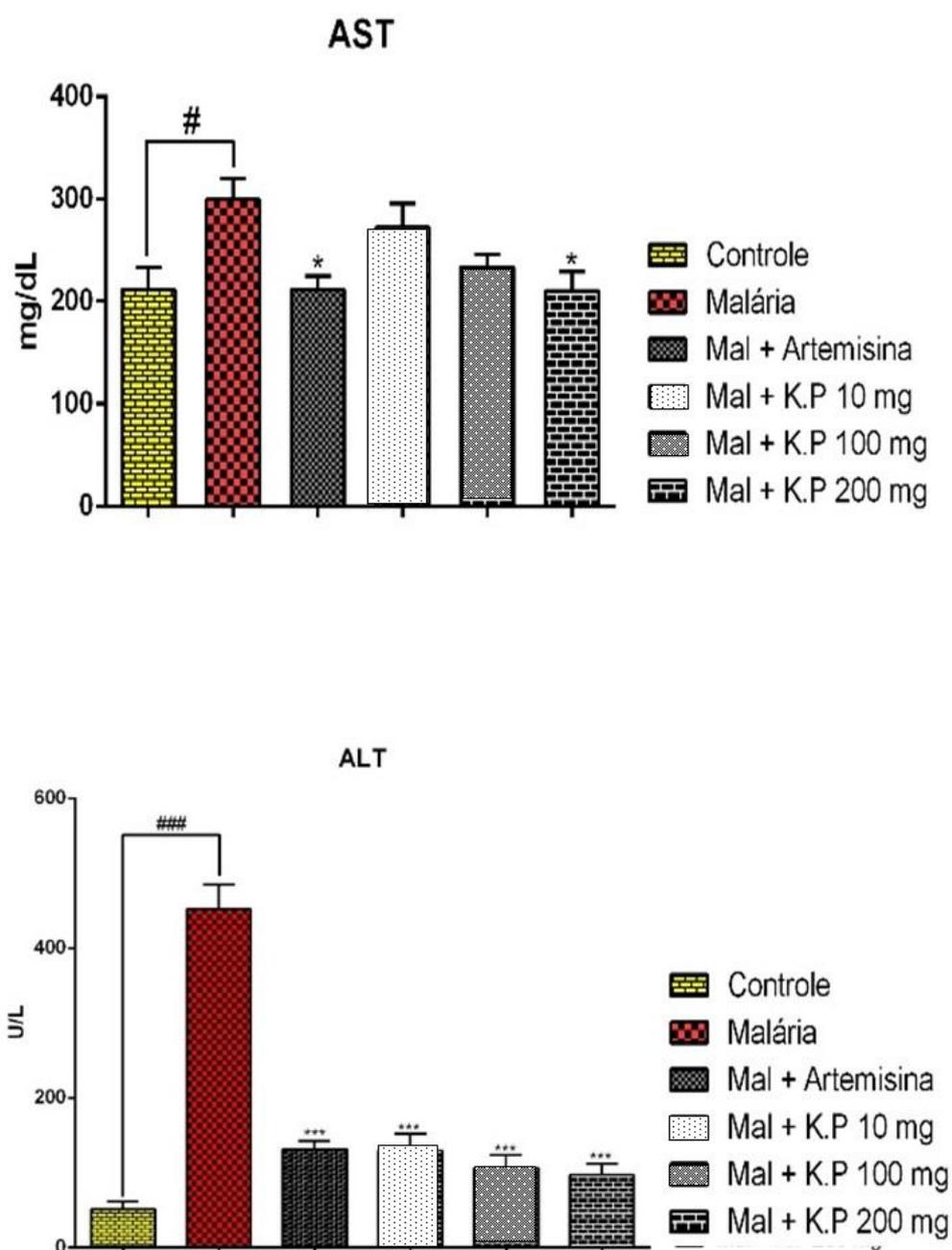


## 5.7 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO HEPÁTICA

Na função hepática é possível observar uma relação inversamente proporcional na concentração de enzimas hepáticas, Alanina Aminotransferase (AST), Aspartato Aminotransferase (ALT) em relação as doses de *K. pinnata* administradas. Também, pode-se observar o aumento significativo das concentrações de AST e ALT do grupo contaminado e não tratado (malária) em relação ao grupo controle negativo (não contaminado), indicando assim a intensa alteração na função hepática ocasionada pela contaminação com o protozoário *Plasmodium berghei*.

Em relação a concentração de AST, as concentrações médias apresentadas foram de 211,6 mg/dL para o grupo controle, 299,4 mg/dL para o grupo malária, e para os grupos tratados que apresentaram resultados estatisticamente diferentes, temos o controle positivo (malária + artemisinina) com 122,4 mg/dL e o grupo contaminado tratado com *K. pinnata* na concentração de 200 mg/kg de massa corporal, com 210 mg/dL de AST. Já em relação a concentração de ALT, as concentrações médias foram 51,1 U/L para o grupo controle negativo e 452,2 U/L para o grupo malária. Todos os grupos tratados apresentaram concentrações de ALT estatisticamente menores que o grupo malária, apresentando valores de 137,4 U/L para o grupo tratado com artemisinina, 129,4 U/L para o tratamento com *K. pinnata* 10 mg, 106,4 U/L para *K. pinnata* 100 mg e 96,8 U/L para *K. pinnata* 200 mg. A Figura 14 apresenta as concentrações das enzimas hepáticas AST e ALT dos animais tratados e não tratados.

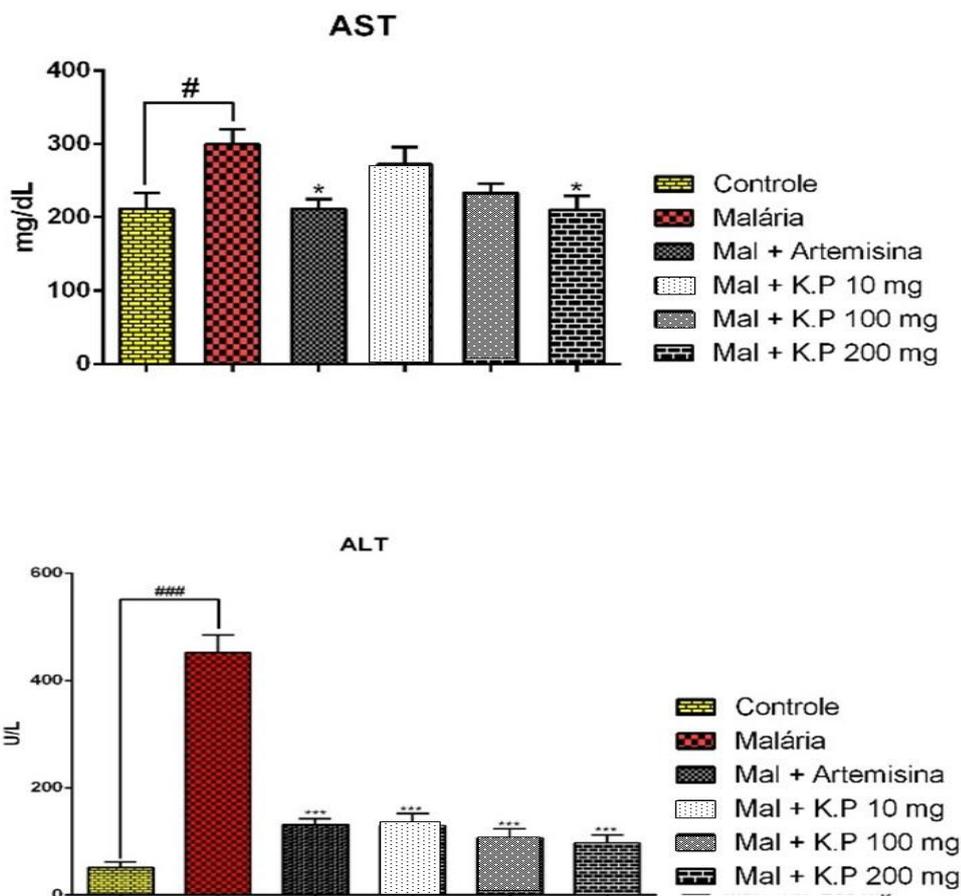
**Figura 14-** Concentração sanguínea das enzimas hepáticas Alanina aminotransferase (AST) e Aspartato Aminotransferase (ALT). Cada barra representa média + Desvio padrão dos níveis de AST em mg/dL e ALT em U/L dos animais analisados no 11<sup>o</sup> dia de tratamento após a inoculação do *P. berghei*, nos grupos experimentais G2 Malária, G3 Artemisinina, G4 *K. pinnata* 200 mg, G5 *K. pinnata* 100 mg e G6 *K. pinnata* 10 mg. ### significância estatística ( $p < 0,001$ ), # significância estatística ( $p < 0,05$ ), \*\*\*significância estatística ( $p < 0,001$ ), \*\* significância estatística ( $p < 0,01$ ), \* significância estatística ( $p < 0,05$ ) nos níveis de AST e ALT dos animais dos grupos Controle e tratados com Artemisinina 100 mg, *K. pinnata* 200 mg, *K. pinnata* 100 mg e *K. pinnata* 10 mg quando comparados ao grupo Malária (ANOVA, seguido do teste Tukey).



## 5.8 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO RENAL

A função renal dos animais estudados, contaminados com *P. berghei*, tratados com *K. pinnata* em diferentes doses e os grupos controle, foi avaliada segundo as concentrações de creatinina e uréia para verificação da ação do protozoário e do extrato sobre o funcionamento dos rins, conforme apresentado na Figura 15. Pode-se observar que o grupo 1 (controle negativo) apresentou níveis médios de creatinina e uréia (0,8 mg/dL e 62 mg/dL respectivamente) significativamente inferiores aos dos animais contaminados com *P. berghei* não tratados (1,03 mg/dL para creatinina e 91 mg/dL para uréia), indicando assim que a infecção ocasiona alteração da função renal dos animais. Para a creatinina, os animais tratados com *K. pinnata* nas três diferentes doses avaliadas apresentaram concentrações estatisticamente menores (0,58 mg/dL, 0,68 mg/dL e 0,6 mg/dL para 10mg, 100 mg e 200 mg de *K. pinnata* respectivamente) que do grupo malária (1,03 mg/dL), assim como o grupo controle positivo, tratado com artemisinina (0,78 mg/dL), indicando assim que o extrato foi capaz de manter a concentração dessa substância, indicativo de manutenção da função renal. Já em relação a uréia, apenas os grupos tratados com artemisinina (52 mg/dL) e *K. pinnata* na concentração de 10 mg/kg (73 mg/dL) apresentaram concentrações médias estatisticamente menores do que o grupo contaminado e não tratado (malária), que apresentou concentração média de 91 mg/dL de uréia.

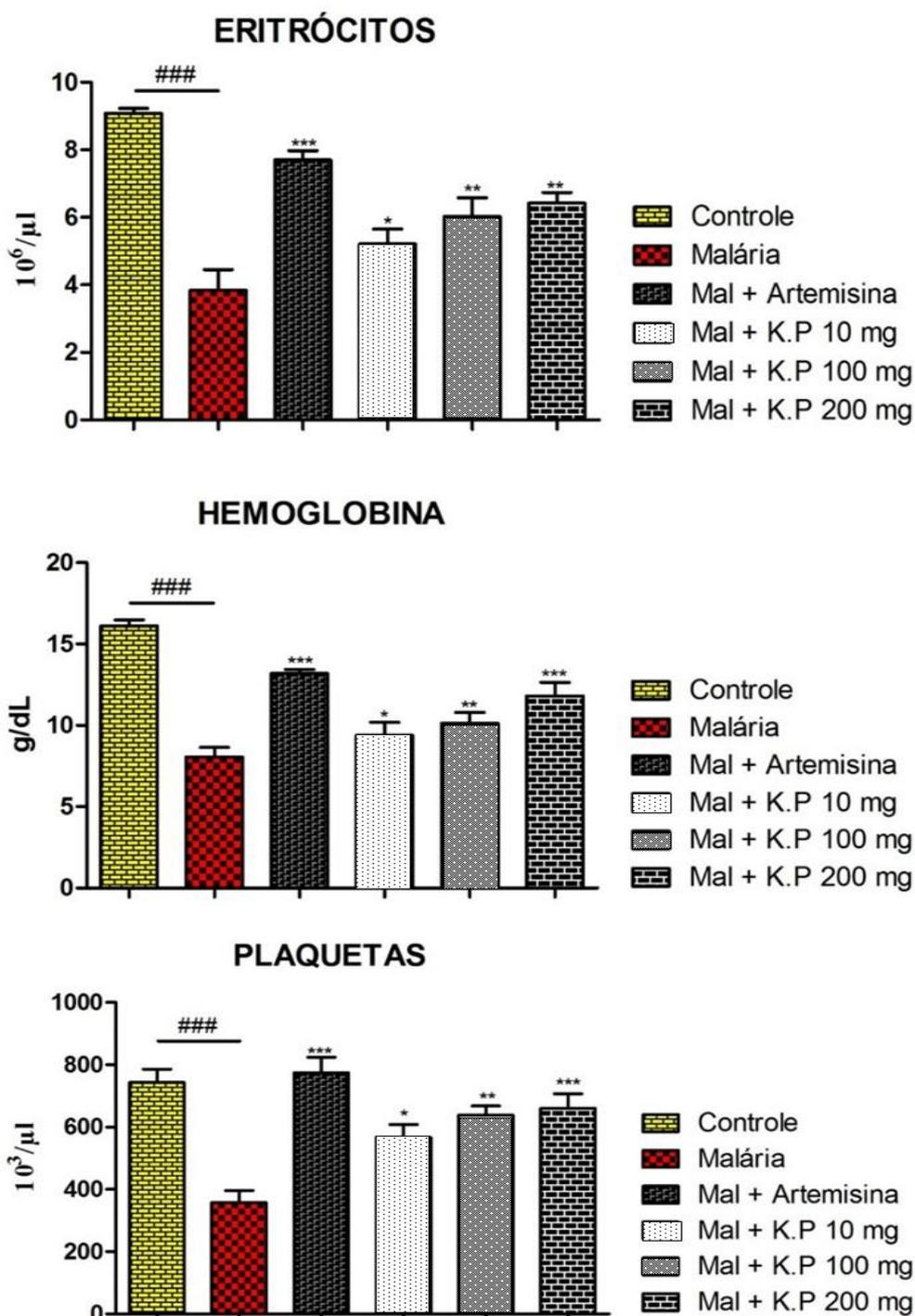
**Figura 15-** Avaliação da função renal (concentração de creatinina e uréia sanguíneas). Cada barra representa média + Desvio padrão dos níveis de creatinina e uréia em mg/dL dos animais analisados no 11º dia de tratamento após a inoculação do *P. berghei*, nos grupos experimentais G2 Malária, G3 Artemisinina, G4 *K. pinnata* 200 mg, G5 *K. pinnata* 100 mg e G6 *K. pinnata* 10 mg. ### significância estatística ( $p < 0,001$ ) \*\*\*significância estatística ( $p < 0,001$ ), nos níveis de creatinina e uréia dos animais dos grupos Controle e tratados com Artemisinina 100 mg, *K. pinnata* 200 mg, *K. pinnata* 100 mg e *K. pinnata* 10 mg quando comparados ao grupo Malária (ANOVA, seguido do teste Tukey).



## 5.9 PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS

Foram avaliados os parâmetros hematológicos dos animais infectados com *P. berghei* não tratados e tratados com artemisinina e extrato de *K. pinnata*, os quais são apresentados na Figura 16. Os eritrócitos, hemoglobinas e plaquetas dos animais contaminados e não tratados mostram-se estatisticamente menores que do grupo controle negativo. Nestes parâmetros, tanto o grupo tratado com artemisinina como os grupos tratados com *K. pinnata* apresentaram níveis estatisticamente superiores ao grupo malária.

**Figura 16-** Avaliação dos parâmetros hematológicos. Cada barra representa média + Desvio padrão dos níveis de eritrócitos ( $10^6/\mu\text{L}$ ), hemoglobinas (g/dL) e plaquetas ( $10^3/\mu\text{L}$ ) dos animais analisados no 11º dia de tratamento após a inoculação do *P. berghei*, nos grupos experimentais G2 Malária, G3 Artemisinina, G4 *K. pinnata* 200 mg, G5 *K. pinnata* 100 mg e G6 *K. pinnata* 10 mg. ### significância estatística ( $p < 0,001$ ), \*\*\*significância estatística ( $p < 0,001$ ), \*\* significância estatística ( $p < 0,01$ ), \* significância estatística ( $p < 0,05$ ) nos níveis de eritrócitos, hemoglobina e plaquetas dos animais dos grupos Controle e tratados com Artemisinina 100 mg, *K. pinnata* 200 mg, *K. pinnata* 100 mg e *K. pinnata* 10 mg quando comparados ao grupo Malária (ANOVA, seguido do teste Tukey).



## 6 DISCUSSÃO

No presente estudo, verificou-se que o extrato de *K. pinnata* pode ser administrado com segurança nas doses avaliadas, para o tratamento da malária, apresentando eficácia similar a artemisina. Observou-se o incremento do tempo de sobrevivência, assim como supressão parasitária, controle dos níveis glicêmicos e das funções renais e hepatológicas, e ainda, dos parâmetros hematológicos. Esses resultados reforçam a ideia da eficácia da espécie vegetal estudada para o tratamento proposto.

Sabe-se que a *K. pinnata* é uma planta de uso frequente na medicina popular em diferentes regiões do mundo, e particularmente na América do Sul. Na literatura, são descritos sua atividade antileishmania, hepatoprotetiva, antimicrobiana, antidiabético e antinociceptivo (EL ABDELLAOUI *et al.*, 2010). Não foi encontrado nenhum trabalho na literatura que descreva a atividade antimalárica do extrato hidroalcoólico da espécie *K. pinnata*, o que atribui o ineditismo deste estudo.

A análise química da *K. pinnata* por cromatografia líquida de alta performance mostrou pelo menos três picos majoritários com absorção nos comprimentos de onda 254 nm, representando os compostos de anel aromático, 280 nm representando os compostos de anel aromático com hidroxila e 360 nm representando os flavonoides, sendo típicos de absorções de compostos fenólicos, dentre os quais pertencem os flavonoides. Os flavonoides são absorvidos em comprimentos de onda de 254, 280 e 360 nm (KUMAR, 2017). Os sinais observados são indicativos da presença de flavonoides, como por exemplo a quercitrina, kaempferol, eupafolina e palutelina, já encontrados na espécie. No intervalo de tempos de retenção entre 11,88 min e 12,67 min, onde para o pico majoritário, foram observadas absorção UV-Vis em 326 e 338 nm correspondentes aos picos presentes no extrato, indica-se também que essas substâncias são altamente hidroxiladas e consecutivamente de alta polaridade. Observa-se que a partir da taxa de variação do solvente B, os picos apresentaram mais interação com a fase móvel que estava em 75% de água e 25% de solvente orgânico, corroborando com a sugestão de serem substâncias pertencentes às classes dos flavonoides. A análise quantitativa de compostos flavonoides totais a partir da curva de calibração revela que em relação aos compostos da *K. pinnata*, os

flavonoides expressos como rutina representam 4,116% da concentração no extrato utilizado.

Diante dos resultados do gradiente exploratório do extrato hidroalcoólico e avaliação por curva de calibração de compostos fenólicos, indica-se a presença de flavonoides, dos quais podemos sugerir os flavonoides quercitrina, kaempferol, eupafolina, palutelina e rutina, pois já existem relatos na literatura da presença dessas estruturas na espécie. O flavonoide rutina é reconhecido pelo seu efeito antimalárico, como descrito no estudo de Shitlani *et al.* (2016), onde este composto foi avaliado *in vivo* contra *P. falciparum* e *in vitro* contra *P. berghei*, demonstrando boa eficácia antiplasmódica.

Em avaliação fitoquímica efetuada em estudos anteriores, mostrou-se a presença de esteróides, terpenóides, flavonoides, fenólicos, taninos, alcalóides, glicosídeos, carboidratos e proteínas, além de ácido siríngico, ácido caféico, ácido 4-hidróxi-3-metóxi cinâmico, ácido 4-hidróxi benzoico, ácido p-hidróxi cinâmico, ácido p-cumárico, ácido ferúlico, ácido protocatéico e fosfoenolpiruvato nas partes aéreas e astragalino, 3,8-dimetóxi-4,5,7-trihidróxiflavona, friedelina, epigalocatequi-3-O-siringato, luteolina, rutina, canferol, quercetina, quercetina-3L-raminosídeo-L-arabino furanosídeo, quercetina-3-O-diarabinosídeo e canferol-3-glucosídeo (PRASAD *et al.*, 2012; FERNANDES *et al.*, 2016; EL ABDELLAOUI *et al.*, 2010).

Fernandes *et al.* (2016) relata que no extrato hidroetanólico das folhas de *K. pinnata* os compostos identificados por cromatografia gasosa de alta eficiência com detector de massa foram principalmente flavonoides-O-glicosídeos. As agliconas identificadas foram flavona eupafolina e flavonol patuletina, quercetina e canferol, e os açúcares conjugados com essas estruturas foram hexoses (como glicose), pentoses (como arabinose) e deóxi-hexose (como ramnose).

Em relação a toxicidade aguda do extrato da *K. pinnata* em camundongos BALB/c, não foram encontrados na literatura estudos que avaliem sua toxicidade aguda, assim como, para plantas do mesmo gênero, neste sentido, este trabalho vem corroborar para a elucidação da toxicidade aguda desta espécie, segundo o protocolo OCDE-423/2001, que otimiza o uso de animais de experimentação e permite que os próximos estudos de toxicidade para plantas do gênero *Kalanchoe*, que compreende aproximadamente 125 espécies, possa já se iniciar com a dose 2000 mg/kg, dispensando a necessidade de teste de toxicidade aguda nas doses de 5 mg/kg, 50

mg/kg, 300 mg/kg, que são as doses iniciais estabelecidas no referido protocolo. Segundo os critérios de classificação estabelecidos pelo protocolo, o extrato da *K. pinnata* foi classificado com baixo grau de toxicidade aguda, com dose tóxica superior a 2.000 mg/kg, o que permitiu a determinação das doses testadas no presente estudo.

Em relação a dados disponíveis na literatura sobre a toxicidade aguda de extrato de *K. pinnata*, Sousa *et al.* (2005) relatam que em testes na faixa de 100 a 8000 mg/kg, não houve mortes dos camundongos testados, sugerindo alto grau de segurança para o extrato em questão. Segundo Al-Snafi (2013) o extrato aquoso e metanólico de *K. pinnata* não é tóxico oralmente em doses superiores a 3000 mg/kg de massa corporal em ratos e camundongos. Doses de 2000 mg/kg de massa corporal de ratos por administração oral durante 35 dias não causaram alterações histológicas nos rins, coração e baço. Ainda, não se observou nenhuma alteração na massa corporal e nos parâmetros hematológicos e bioquímicos, e também não houve nenhuma morte em uma dose aguda máxima de 5000 mg/kg de massa corporal (AL-SNAFI, 2013). Já em relação a outras espécies do mesmo gênero, como em estudos avaliando a toxicidade de extrato de *Kalanchoe integra* em camundongos, foi determinado DL50 de 230 mg/kg (VARMA *et al.*, 1979). Extrato de *Kalanchoe brasiliensis* não apresentaram efeito letal em camundongos por administração intraperitoneal em doses de 250 mg a 5000 mg/kg em um período de 14 dias, período no qual também não foi observada perda de peso (MOURÃO *et al.*, 1999).

Os animais tratados com *K. pinnata* apresentaram tempo de sobrevivência comparável aos animais tratados com o antimalárico padrão artemisinina para as três doses testadas, também não há relatado na literatura de estudos que avaliem o tempo de sobrevivência de camundongos contaminados por *P. berghei* e tratados com plantas do mesmo gênero ou a espécie deste presente estudo. Entretanto, o tempo de sobrevivência demonstrado em nosso trabalho corrobora com o estudo de Somsak *et al.* (2015) em contaminados por *P. berghei* e tratados com extrato aquoso de *Tinospora crispa*, onde encontraram tempo de sobrevivência de 12 dias para os animais não tratados, bastante similar ao valor encontrado em nosso estudo. Souza *et al.* (2017), em seu estudo com camundongos infectados por *P. berghei* não tratados apresentaram tempo de sobrevivência de 14 dias, enquanto os animais tratados com óleo-resina de *C. reticulata* apresentaram tempo de sobrevivência similar aqueles tratados

com o fármaco artemisinina, de 28 dias, o que reporta comportamento bastante semelhante ao presente estudo em relação ao tempo de sobrevivência pós tratamento.

Em relação a parasitemia, o tratamento com extrato de *K. pinnata* mostrou redução na densidade dos parasitas da malária quando esta foi comparada com as densidades de *Plasmodium berguei* no grupo controle negativo. A parasitemia sanguínea foi reduzida em todos os grupos tratados em comparação ao grupo que somente foi infectado com *Plasmodium berguei*, demonstrando que o extrato de *K. pinnata* consegue destruir o parasita, resultado muito promissor, e que podemos associar aos resultados posteriores, que certamente tem efeito direto desta ação. Os resultados obtidos neste estudo apresentam diferenças em relação ao estudo de Abubakar *et al.* (2014), onde foram avaliadas a ação dos extratos aquosos de *K. pinnata* e *Aloe barbadensis* (separadamente e em ação sinérgica) em concentrações de  $10^{-1}$  a  $10^{-9}$  mg/mL, administrados 5 mL oralmente em camundongos albinos contaminados com *P. berghei*, onde foi observado que o extrato aquoso de *K. pinnata* isoladamente não apresentou ação contra o protozoário, apenas quando combinado com o extrato de *Aloe barbadensis*. Possivelmente, a diferença da ação da *K. pinnata* do presente estudo em relação ao citado deve-se a menor concentração do extrato e ao fato de ser aquoso, diferentemente do presente estudo, hidroalcolólico, que permite a extração de diferentes substâncias presentes na planta. Porém, em estudo de Da Silva *et al.* (1995) o extrato aquoso de *K. pinnata* demonstrou potencial ação contra a infecção por *Leishmania amazonenses*, onde o extrato administrado oralmente em doses de 8 mg em camundongos albinos preveniu o crescimento dos parasitas, com efeito comparado ao da droga antileishmaniana glucantina, o que indica que em doses adequadas, tanto o extrato etanólico quanto aquoso apresentam ação contra diversos parasitas. Também, em estudo de Souza *et al.* (2017) utilizando o óleo-resina de *Copaifera reticulata* para tratamento da malária por *P. berguei*, os resultados foram bastante semelhantes, com redução da parasitemia em níveis semelhantes ao do controle positivo (artemisinina).

Um dos parâmetros analisados nos animais infectados pelo plasmodium e que desenvolveram o quadro de malária foi o nível de glicose. De acordo com Gomes *et al.* (2011), de Sousa *et al.* (2017) e Ghosh *et al.* (2018), a taxa de glicose no sangue está diretamente relacionada com a densidade parasitária, uma vez que os níveis glicêmicos tendem a permanecer baixos durante a infecção por malária, devido ao

consumo de glicose pelo parasita e as possíveis alterações hepáticas e renais que prejudicam a glicogênese.

No presente estudo, os grupos tratados com *K. pinnata* ou artemisina apresentaram glicemia superior em comparação ao grupo malária, onde os grupos tratados com artemisinina e *Kalanchoe pinnata* nas doses de 100 e 200 mg apresentaram resultados estatisticamente significativos. Segundo Ghosh *et al.* (2018), um dos principais efeitos da infecção por malária é a hipoglicemia. O *Plasmodium* spp. necessita de enzimas neoglucogênicas e são, portanto, dependentes da absorção de glicose do hospedeiro. Como resultado, a utilização de glicose é alterada significativamente no hospedeiro. Teoricamente, o aumento do consumo de glicose em um indivíduo com malária, pode ser devido ao aumento do consumo pelo indivíduo ou aumento do consumo pelo parasita, ou a uma combinação de ambos. A glicose é o combustível obrigatório do *Plasmodium* e eritrócitos parasitados consomem até 30 a 75 vezes mais glicose do que contrapartes não infectadas. Na malária em camundongos, a hipoglicemia é de fato correlacionada com hiperparasitemia (> 50%), mas também está correlacionada com hiperinsulinemia, fazendo com que conclusões sobre o efeito do consumo da glicose pelo parasita na glicose plasmática sejam impossíveis. O consumo por parte dos parasitas é considerado um "fator contribuinte" ao invés de "fator causal" da hipoglicemia por causa da grande diferença na demanda de glicose entre os parasitas e o paciente gravemente doente e febril. No hospedeiro, as altas demandas metabólicas da doença febril aumentam a necessidade de glicose. Sabe-se que a taxa de depuração da glicose aumenta em 40-70% na malária grave, mas apenas 20% na malária *falciparum* sem complicações (Thien *et al.*, 2006).

Em estudo de de Sousa *et al.* (2017) em camundongos contaminados por *P. berghei* apresentaram diminuição nos níveis glicêmicos quando não tratados, assim como os resultados reportados no presente estudo. Também, o tratamento com a resina de *C. reticulata* foi eficiente na manutenção da concentração glicêmica em níveis semelhantes a artemisinina, apresentando também comportamento bastante similar ao observado em nosso trabalho.

Também, outros danos podem ser ocasionados pela infecção pela malária, como os problemas hepáticos. Na avaliação dos parâmetros hepáticos, foi observado que os grupos tratados com artemisina e *K. pinnata* apresentaram valores estatisticamente inferiores aos do grupo contaminado e não tratado. Não há portanto, relatos na

literatura de estudos que avaliem parâmetros hepáticos de camundongos tratados com extratos de *K. pinnata* em relação a infecção por *P. berghei*.

Diversos estudos relatam os danos hepáticos ocasionados pelo *P. berghei* em modelo murino. Haque *et al.* (2011) avaliaram os danos hepáticos ocasionados pelo *P. berghei* em camundongos C57BL/6 nos dias 4, 5 e 6 após a infecção e reportaram que apesar de os animais ainda não apresentarem danos cerebrais, como são esperados na infecção por essa espécie do protozoário, estes já apresentavam danos hepáticos, com elevação dos níveis de AST e ALT. Scaccabarozi *et al.* (2018) compararam os danos hepáticos ocasionados por *P. berghei* e *P. chabaudi*. Nos fígados de camundongos infectados com *P. berghei*, tanto os parasitas quanto a hemozoína acumularam-se em maior extensão do que nos fígados de camundongos infectados por *P. chabaudi*, embora no última a hepatomegalia fosse mais evidente (SCACCABAROZZI *et al.*, 2011). Enzimas hepáticas foram aumentados em ambos os modelos. Além disso, em camundongos infectados com *P. berghei*, houve aumento da peroxidação lipídica, acúmulo de triglicerídeos, comprometimento de enzimas antioxidantes e maior deposição de colágeno (SCACCABAROZZI *et al.*, 2011). Em estudo de de Souza *et al.* (2017), foi observado também que a infecção de camundongos por *P. berghei* ocasionou aumento dos níveis de AST e ALT, os quais foram diminuídos no tratamento com resina de *C. reticulata* de forma semelhante a artemisinina.

O envolvimento hepático em casos de infecção por malária é um fato bem reconhecido. A disfunção hepatocelular da malária é caracterizada por um aumento nos níveis séricos de bilirrubina e aminotransferases, excedendo até três vezes o limite superior dos valores normais. A hepatopatia malárica está associada a uma maior incidência de malária cerebral, síndrome do desconforto respiratório agudo e lesão renal aguda. Suspeita-se que a hepatopatia malárica está relacionada à ativação de macrófagos hepáticos que fagocitam hemácias ou hemácias parasitadas. Necrose hepatocítica focal, colestase e lesões granulomatosas também são relatados. Em pacientes com malária com icterícia, alterações histopatológicas na forma de hepatócitos danificados, congestão de células hepáticas, deposição de hemozoína, infiltrados inflamatórios e colestase foram demonstradas, bem como células hiperplásicas de Kupffer (SCACCABAROZZI *et al.*, 2018).

Em relação a ação do *Kalanchoe pinnata*, Torres-Santos *et al.* (2003) relatam que camundongos foram usados para determinação dos parâmetros toxicológicos dessa espécie de planta na dosagem de 16 mg de extrato por dia, a qual foi comparada com Glucantime. Foi observado que AST e ALT dos animais tratados com *K. pinnata* mantiveram-se muito próximos ao grupo controle, enquanto o grupo tratado com Glucantime apresentou níveis muito elevados das enzimas hepáticas, demonstrando a baixa toxicidade do extrato. Também Ghasi *et al.* (2011) avaliaram a ação de *K. pinnata* em coelhos tratados por 4 semanas com 150 mg/kg de massa corporal e identificaram que não houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo tratado e o grupo controle, indicando assim a segurança do uso do extrato.

Assim, considerando que a infecção pelo *Plasmodium berghei* ocasiona aumento dos níveis das enzimas hepáticas AST e ALT, além de outros possíveis danos hepáticos, porém, nossos dados demonstram que o tratamento com extrato de *K. pinnata* manteve os níveis de tais enzimas em valores normais.

Sabe-se que o desenvolvimento da malária coincide com a acumulação dos parasitas em diferentes órgãos como coração, pulmões, baço, fígado, trato gastrointestinal e rins. Um alto nível de creatinina plasmática é um dos principais fatores associados com a mortalidade em organismos infectados com *Plasmodium*, indicando que o comprometimento da função renal é um grande fator de risco para esses pacientes infectados com malária. Foi proposto que a lesão renal depende da citoadescrição dos eritrócitos infectados à microvasculatura e à resposta imune do hospedeiro, que desempenham um papel no dano tubular e glomerular, respectivamente (ABREU *et al.*, 2014).

Foi observado neste estudo que os animais tratados com artemisina ou *K. pinnata* apresentaram níveis de uréia e creatinina inferiores aquele grupo contaminado e não tratado, semelhantes ao grupo controle. Assim, os resultados apresentados estão de acordo com os dados reportados por Abreu *et al.* (2014), onde camundongos infectados com *P. berghei* apresentaram aumento no nível de creatinina e uréia plasmática após 5 dias de infecção. Já em relação a ação do extrato, pode-se verificar que o uso da dose de 10 mg/kg de massa corporal apresentou comportamento semelhante aos resultados relatados por Torres-Santos *et al.* (2003), onde camundongos tratados com 16 mg/dia de extrato de *K. pinnata* não indicaram aumento no nível de uréia devido ao tratamento. Em estudo de Ghasi *et al.* (2011)

utilizando extrato de *K. pinnata* na dose de 150 mg/kg em coelhos por 4 semanas, foi observado uma diminuição nos níveis de creatinina e uréia em comparação aos animais que não receberam tratamento. Portanto, considerando-se os resultados obtidos, pode-se verificar que além da eficiência em relação ao controle da infecção do *P. berghei*, o extrato de *K. pinnata* não induz a danos renais nos animais tratados, indicando sua segurança. de Souza *et al.* (2017), demonstraram que o tratamento com *C. reticulata* de camundongos infectados por *P. berghei*, reportaram resultados bastante similares, onde todas as concentrações de *C. reticulata* testadas foram eficientes na diminuição dos níveis de creatinina, porém, o tratamento na dose mais baixa da resina não foi eficiente na diminuição do nível de uréia assim como a artemisinina, e sugerem que o óleo contribui para um aumento da microcirculação, redução da citoaderência dos eritrócitos com diminuição significativa da parasitemia, de forma análoga podemos dizer sobre nossos resultados com o extrato de *K. pinnata*.

Alguns dos principais sintomas nas infecções por malária são anemia, trombocitopenia e leucocitose. Pacientes com malária desenvolvem complicações hematológicas e alterações em parâmetros bioquímicos. As manifestações da malária são resultadas da infecção dos glóbulos vermelhos pelas formas assexuadas do parasita *Plasmodium*, a qual faz da malária uma potencial doença multissistêmica porque todos os órgãos do corpo dependem do sangue para o seu metabolismo. A infecção de glóbulos vermelhos por parasitas da malária pode levar a modificações estruturais, bioquímicas e fisiológicas das células vermelhas do sangue, portanto, resultando em alguns sintomas de risco de vida. Além disso, os parasitas da malária atacam os glóbulos vermelhos causando suas lises o que pode resultar na redução do nível de hemoglobina e volume das células. Vários fatores fisiopatológicos como densidade do parasita; toxinas da malária e resposta inflamatória; citoaderência; alteração, deformabilidade e fragilidade de eritrócitos parasitados; lesão e disfunção da ativação endotelial e alteração na trombostase podem estar envolvidos no desenvolvimento de malária grave (Asanga *et al.*, 2017).

Os resultados aqui apresentados, onde eritrócitos, hemoglobinas e plaquetas dos animais contaminados e não tratados apresentam-se inferiores ao grupo controle negativo, e o grupo tratado com artemisinina como os grupos tratados com *K. pinnata* apresentaram níveis superiores ao grupo malária, demonstram que o o extrato de *K. pinnata* apresenta a capacidade de impedir a destruição destas células, possivelmente

devido a sua capacidade de destruir o *P. berghei* demonstrado na avaliação quantitativa do número de parasitas presentes no sangue durante os dias 7 e 11 após a inoculação que demonstraram diferenças estatisticamente significativas na porcentagem das médias da densidade parasitária. Possivelmente, essa capacidade de reduzir a parasitemia deve-se a ação dos compostos antioxidantes presentes no extrato, visto que o *Plasmodium* sp é muito sensível ao estresse oxidativo, ou seja, eles são suscetíveis a radicais livres e oxidantes. Um agente que exibe alta capacidade antioxidante pode promover um aumento da capacidade antioxidante total do hospedeiro e diminuição da peroxidação lipídica, alterações que estão correlacionadas a redução significativa da parasitemia. Nossos resultados são semelhantes aos obtidos por Olutayo *et al.* (2013), que estudou camundongos infectados por *P. berghei* e tratados com artesunato como controle positivo e tratados com extrato de *Anogeissus leiocapus* por via oral. Tais pesquisadores observaram que a concentração de hemoglobina e eritrócitos no grupo contaminado e não tratado foi inferior ao grupo não contaminado, e que apenas o grupo controle positivo (tratado com artesunato) apresentou diferença estatística em relação ao grupo contaminado e não tratado, indicando que no caso, o extrato em questão não apresentou resultados significativos no controle da anemia provocada pelo *P. berghei*. Também neste estudo citado, a concentração de plaquetas do grupo contaminado e não tratado apresentou-se superior ao grupo controle. Porém, quando comparados os níveis de plaquetas dos grupos tratados em relação ao grupo não tratado, não se observou diferença significativa para o grupo artesunato, enquanto o grupo tratado com a maior dose de extrato de *Anogeissus leiocapus* apresentou trombocitose ainda mais elevada que no grupo malária, diferentemente do presente estudo, onde o extrato de *K. pinnata* possibilitou o controle dos níveis plaquetários.

## 7 CONCLUSÕES

Considerando-se os resultados obtidos no presente estudo, pode-se compreender que o extrato hidroalcolico de folhas de *K. pinnata* apresenta dentre seus compostos químicos, a rutina, com atividade antiplasmódica reconhecida.

No estudo *in vivo* em camundongos, o extrato *K. pinnata* se mostrou seguro para a função proposta em doses de até 2000 mg/kg de massa corporal.

O tempo de sobrevivência aumentou de aproximadamente 12 dias para os animais contaminados não tratados para cerca de 28 dias para os animais tratados com extrato de *K. pinnata*.

Em relação a evolução da parasitemia, foi observado que o extrato de *K. pinnata* nas três doses estudadas apresentou eficácia comparável à da artemisinina, diminuindo de forma significativa a densidade do parasita *P. berghei*.

Para os animais infectados pelo *P. berghei*, os quais apresentaram diminuição nos níveis glicêmicos, o extrato de *K. pinnata* foi capaz de aumentar significativamente tais níveis, de forma semelhante ao fármaco artemisina. Os níveis glicêmicos, para os animais infectados, foram inversamente proporcionais a parasitemia, porém o extrato de *K. pinnata* foi capaz de reduzir a parasitemia e elevar os níveis glicêmicos a normalidade.

Em relação aos parâmetros hematológicos, os animais contaminados com *P. berghei* e tratados com extrato de *K. pinnata* apresentaram níveis estatisticamente superiores de eritrócitos, hemoglobinas e plaquetas em comparação aos animais contaminados e não tratados, que apresentaram diminuição dos parâmetros hematológicos avaliados.

Também foi observado que o extrato de *K. pinnata* diminuiu os danos hepáticos ocasionados pela contaminação com o *P. berghei* de forma similar a observada com a artemisinina, mantendo-se os índices de Alanina Aminotransferase e Aspartato Aminotransferase dentro dos valores observados pelo grupo não contaminado.

O extrato de *K. pinnata* possibilitou a manutenção dos níveis de uréia e creatinina semelhantes ao grupo controle negativo e inferiores ao grupo contaminado e não

tratado, indicando assim a eficiência do extrato proposto na proteção renal contra a ação do *P. berghei*.

Assim, o extrato de *K. pinnata* apresentou resultados promissores no tratamento da malária em camundongos. Considerando-se o desenvolvimento de resistência aos medicamentos antimaláricos mais comuns, o estudo *in vivo* em modelo murino possibilitou a compreensão dos efeitos do extrato estudado em relação a atividade antiplasmódica, possivelmente devido ao potencial antioxidante dos compostos fenólicos presentes e demonstrou a sua baixa toxicidade aguda, indicando assim que tal extrato se apresenta como potencial alternativa para novas pesquisas que possibilite o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da malária.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, T. P. *et al.* Mice rescued from severe malaria are protected against renal injury during a second kidney insult. **PLoS One**, v. 9, n. 4, p. e93634, 2014.
- ABUBAKAR *et al.* Investigation of anti-plasmodium activity of a combined extract of *Bryophyllum pinnatum* and *Aloe barbadensis* leaves. **International Journal of Science and Nature**, v. 5, n.1, p.67-70, 2014.
- ACHAN, J. *et al.* Quinine, an old anti-malarial drug in a modern world: role in the treatment of malaria. **Malaria journal**, v. 10, n. 1, p.144, 2011.
- ALANO, P. Plasmodium falciparum gametocytes: still many secrets of a hidden life. **Molecular microbiology**, v. 66, n. 2, p.291-302, 2007.
- AL-SNAFI, A. E. The Chemical constituents and pharmacological effects of *Bryophyllum calycinum*. A review. **Journal of Pharma Sciences and Research**, v. 4, n. 12, p. 171-176, 2013.
- AMIR, A. Stem cell engineering might be protective against severe malaria. **Bioscience Hypotheses**; v. 20, p. 1-2, 2009.
- ANTINORI, S. *et al.* Biology of human malaria plasmodia including Plasmodium knowlesi. **Mediterranean journal of hematology and infectious diseases**, v. 4 n. 1, 2012.
- ARAUJO, A. C. P. **Aislamiento y elucidación estructural de los metabolitos secundarios presentes en las ramas de *Sebastiania longicuspis* (Euphorbiaceae)**, Monografía, Universidad Central del Ecuador, Quito, 2013.
- ARTAVANIS-TSAKONAS, K.; RILEY, E. M. Innate immune response to malaria: rapid induction of IFN-gamma from human NK cells by live *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes. **The Journal of Immunology**, n. 169, p.2956-2963, 2002.
- ASANGA, E. *et al.* Hematological indices of *Plasmodium berghei* infected mice treated with ethanol extract and fractions of *Nauclea latifolia* roots. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 6, n.12, p. 2546-2556, 2017.
- AYYUB, M.; BARLAS, S.; LUBBAD, E. Usefulness of exchange transfusion in acute liver failure due to severe falciparum malaria. **The American journal of gastroenterology** v. 95, p.802, 2000.
- BAHETI, R.; LADDHA, P.; GEHLOT R.S. Liver involvement in falciparum malária - A histo-pathological analysis. **Journal Indian Academy of Clinical Medicine**. v. 4, n. 1, p.8-34, 2003.
- BARSOUM, R. S. Malaria acute renal failure. **Journal of the American Society of Nephrology** . v.11, n. 11, p.2147-54, 2000.
- BISWAS, S. K. *et al.* Assessment of cytotoxicity and antibacterial activities of ethanolic extracts of *Kalanchoe pinnata* linn. (family: Crassulaceae) leaves and stems. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 2, n. 10, p. 2605, 2011.
- BOLAD, A.; BERZINS, K. Antigenic diversity of *Plasmodium falciparum* and antibody-mediated parasite neutralization. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 52, p.233-239, 2000.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Manual de terapêutica da malária**. Brasília, 2001. 104 p.

- BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Diagnóstico Laboratorial da Malária**. 1ªed. Brasília, 2005.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia prático de tratamento da malária no Brasil**. Brasília, 2010.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Plano Nacional de Saúde – PNS**. Brasília, 2011.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Lista de municípios pertencentes às áreas de risco ou endêmicas para malária**. Brasília, 2018.
- BRAZ FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, v.33, p. 229-239, 2010.
- BRUNTON, L. L., CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, C. V. **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman** – 12. Ed. – Porto Alegre: AMGH, 2012.
- BUENO, L. L. **Resposta Imune Celular e Humoral de pacientes infectados por *Plasmodium vivax* frente ao antígeno 1 de membrana apical (AMA-1)**. Tese de doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.
- BUFFET, P. A., *et al.* The pathogenesis of *Plasmodium falciparum* malaria in humans: insights from splenic physiology. **Blood**, v.117, n. 2, p.381-392, 2011.
- CLARK I. A. *et al.* Human malarial disease: a consequence of inflammatory cytokine release. **Malaria journal**, v. 5, n. 85, 2006.
- CORTINA, A. D. M.; TOBON, A. Ictericia y hepatopatía en el paciente con malaria. **Infectio**, v. 14, n. 4, p.277-285, 2010 .
- COSTA, E. V. M. **Estudo etnobotânico sobre plantas utilizadas como antimaláricas no estado do Amapá, avaliação da atividade antimalárica e toxicidade aguda por via oral de *Amasonia campestris* (Aubl.) Moldenke**. Tese de Doutorado em Biodiversidade Tropical, Universidade Federal do Amapá, Macapá, 2013.
- COSTA, S. S. *et al.* Therapeutic potential of *Kalanchoe* species: flavonoids and other secondary metabolites. **Natural Product Communications**, v. 3, n. 12, p.2151-2164, 2008.
- COWMAN, A. F.; BERRY, D.; BAUM, J. The cellular and molecular basis for malaria parasite invasion of the human red blood cell. **Journal of Cell Biology**, v. 198, n. 6, p. 961-971, 2012.
- CRUZ, E. A. *et al.* Immunomodulatory pretreatment with *Kalanchoe pinnata* extract and its quercitrin flavonoid effectively protects mice against fatal anaphylactic shock. **International immunopharmacology**, v. 8, n. 12, p. 1616-1621, 2008.
- CUI, L. *et al.* Antimalarial drug resistance: literature review and activities and findings of the ICEMR network. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 93, n. 3 Suppl, p. 57-68, 2015.
- CUNICO, W. *et al.* Fármacos antimalaríais - história e perspectivas. **Revista Brasileira de Farmacologia**, v. 89, n. 1, p.49-55, 2008.
- DA SILVA, S. A. G. *et al.* Therapeutic effect of oral *Kalanchoe pinnata* leaf extract in murine leishmaniasis. **Acta Tropica**, v. 60, n. 3, p. 201-210, 1995
- DAS, S. N. *et al.* Malarial hepatitis as a component of multiorgan failure — a bad prognostic sign. **Journal of the Indian Medical Association**, v. 105, p.247–250, 2007.
- DE SOUZA, G. A. G. *et al.* *In vitro* and *in vivo* antimalarial potential of oleoresin obtained from *Copaifera reticulata* Ducke (Fabaceae) in the Brazilian Amazon rainforest. **Phytomedicine**, v. 24, p. 111–118, 2017.
- DIALLO, M. *et al.* Decrease of lymphoid dendritic cells in blood from malaria-infected pregnant women, **International journal for parasitology**. v. 38, p.1557-1565, 2008.

- DONDORP, A. M. *et al.* Direct in vivo assessment of microcirculatory dysfunction in severe falciparum malaria. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 197, n. 1, p.79-84, 2008.
- EL ABDELLAOUI, S. *et al.* Bioactive molecules in *Kalanchoe pinnata* leaves: extraction, purification, and identification. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 398, n. 3, p. 1329-38, 2010
- ELSHEIKHA, H. M.; SHEASHAA, H.A. Epidemiology, pathophysiology, management and outcome of renal dysfunction associated with plasmodia infection. **Parasitology Research**, v. 101, p.1183–1190, 2007.
- EL-SHOURA S.M. Falciparum malaria in a naturally infected human patients: IX. Histiocyte ultrastructure in bone marrow mimicking malignant histiocytosis. **Tropical Medicine and Parasitology**, 1994.
- FAUCI *et al.* (editors). **Medicina interna Harrison**, 18 ed. – Porto Alegre; AMGH, 2013.
- FAZIL, A. *et al.* Clinical profile and complication of malaria hepatopathy. **Journal of Infection and Public Health**, v. 6, n. 5, p.383-388, 2013.
- FERNANDES, J. M. *et al.* Inhibitory Effects of Hydroethanolic Leaf Extracts of *Kalanchoe brasiliensis* and *Kalanchoe pinnata* (Crassulaceae) against Local Effects Induced by Bothrops jararaca Snake Venom. **PLOS ONE**, v. 11, n. 12, p. e0168658, 2016.
- FERREIRA, R. T. *et al.* Mechanisms underlying the antinociceptive, antiedematogenic, and anti-inflammatory activity of the main flavonoid from *Kalanchoe pinnata*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, 2014.
- FERREIRA, A. B. **Plantas utilizadas no tratamento de malária e males associados por comunidades tradicionais de Xapuri, AC e Pauini, AM**. Tese de Doutorado em Agronomia - Horticultura. Universidade Estadual de São Paulo, Botucatu, 2015.
- FOLEY, M.; TILLEY L. Quinoline antimalarials: mechanisms of action and resistance. **International Journal for Parasitology**, v. 27, p.231–240, 1997.
- FRANÇA, T. C. C.; SANTOS, M. G.; FIGUEROA-VILLAR, J. D. Malária: aspectos históricos e quimioterapia. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1271-1278, 2008.
- FRANCISCO, A. I., VARGAS, M. D. Ferroquina: O Antimalárico do Futuro, **Revista virtual de Química**, v. 2, n. 2, p. 118-129, 2010.
- FUNARI, C. S.; FERRO, V. O. Uso ético da biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 2, p. 178-182, 2005.
- GARCÊS, H. M. P. *et al.* Evolution of asexual reproduction in leaves of the genus *Kalanchoe*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 39, p. 15578-15583, 2007.
- GERALD, N.; MAHAJAN, B.; KUMAR, S. Mitosis in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Eukaryotic cell**, v. 10, n. 4, p.474-482, 2011.
- GHASI, S. *et al.* Assessment of the medical benefit in the folkloric use of *Bryophyllum Pinnatum* leaf among the Igbos of Nigeria for the treatment of hypertension. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 5, n.1, p. 83-92, 2011.
- GHOSH, S. *et al.* Metabolomic changes in vertebrate host during malaria disease progression. **Cytokine**, 2018, *in press*.

- GIGLIOLI, G. Malaria and renal disease with special reference to British Guiana. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 56, p. 225–24, 1962.
- GOMES, A.P, *et al.* Malária grave por *Plasmodium falciparum*. **Revista brasileira de terapia intensiva**, v. 23, n. 3, p.358-369, 2011.
- GOMES, D. C. O. *et al.* Effectiveness of the immunomodulatory extract of *Kalanchoe pinnata* against murine visceral leishmaniasis. **Parasitology**, v. 137, n. 04, p. 613-618, 2010.
- GOMES, M. S. M. **Monitoramento da concentração plasmática da quinina e da mefloquina em pacientes com malária por *Plasmodium falciparum* no estado do Amapá – Brasil**. Dissertação de Mestrado em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários. Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará. Belém. 2006.
- GONÇALVES, F. S. M. **Mecanismo de ação relacionados à atividade antiúlcera de *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. (Crassulaceae)**, Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.
- GUINOVART, C. *et al.* The Role of Age and Exposure to *Plasmodium falciparum* in the Rate of Acquisition of Naturally Acquired Immunity: A Randomized Controlled Trial, **PLoS ONE**, v.7, n.3, e32362.
- GUSTAFSSON, L.L., BEERMAN, B., ABBI, Y. A. **Handbook of drugs for Tropical Parasitic Infection**. London. New York and Philadelphia, 58- 59, p.122-126, 1987.
- HALDAR K, MOHANDAS N. **Malaria, erythrocytic infection, and anemia. Hematology America Society Hematology Educacional Program**. p.87-93, 2009.
- HANSEN, D. S.; SCHOFIELD, L. Natural Regulatory T Cells in Malaria: Host or Parasite Allies. **PLoS Pathog**; v. 6 n. 4; p. 1-9, 2010.
- HAQUE, A. *et al.* High parasite burdens cause liver damage in mice following *Plasmodium berghei* ANKA infection independently of CD8(+) T cell-mediated immune pathology. **Infect Immun**, v. 79, n. 5, p. 1882-8, 2011.
- HELMBY, H; JÖNSSON, G.; TROYE-BLOMBERG, M. Cellular changes and apoptosis in spleen and peripheral blood of mice with blood-stage *Plasmodium chabaudi chabaudi* AS. **Infection and Immunity**, v.68, p.1485-1490, 2000.
- HONG, Y.; LAM, J. W.; TANG, B. Z. Aggregation-induced emission. **Chemical Society Reviews**, v. 40, n. 11, p.5361-5388, 2011.
- IWALOKUN, B. A.; BAMIRO S. B.; OGUNLEDUN A. Levels and inter-actions of plasma xanthine oxidase, catalase and liver function parameters in Nigerian children with *Plasmodium falciparum* infection. **APMIS** 2006 v. 50, p. 114:842, 2006.
- JAIN, V. C.; SHAH, D. P.; PATEL, N. M. Microscopical and preliminary phytochemical studies on leaves of *Bryophyllum calycinum* Salisb. **Journal of Pharmacy Research Vol**, v. 1, n. 2, 2008.
- JORGE, R.. **Doenças associadas a artrópodes vetores e roedores**. Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo. Lisboa, 2014.
- JOSLING, GABRIELLE A; LLINÁS, M. Sexual development in *Plasmodium* parasites: knowing when it's time to commit. **Nature Reviews Microbiology** v. 13, no. 9, 2015.
- KABIRU, A. *et al.* Evaluation of Haematological Changes in *Plasmodium-berghei*-infected Mice Administered with Aqueous Extract of *Phyllanthus amarus*. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 16, n. 11, p. 510, 2013.
- KAMBOJ, A.; SALUJA, A. K. *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Kurz: phytochemical and pharmacological profile: A review. **Pharmacognosy Review**, v. 3, n. 6, p. 364-375, 2009.

- KARUNAWEERA, N. D. *et al.* The paroxysm of *Plasmodium vivax* malaria. **Trends in Parasitology**, v. 19, p.188-193, 2003.
- KIBUKAMUSOKE, J. W.; HUTT, M.S.; WILKS, N. E. The nephrotic syndrome in Uganda and its association with quartan malaria. **Q J Med.** v. 36, p.393–408, 1967.
- KOCHAR, D. P.; SIROHI, P.; KOCHAR, A. Acute hepatitis in malaria. **Journal Gastroenterology and Hepatology**, v. 2, 2006.
- KORBEL, S.D.; FINNEY, O.C.; RILEY, E.M. Natural killer cells and innate immunity to protozoan pathogens. **International Journal for Parasitology**, v. 34, p.1517 - 1528, 2004.
- KUMAR, R. B. Application of HPLC and ESI-MS techniques in the analysis of phenolic acids and flavonoids from green leafy vegetables (GLVs). **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 7, p. 349-364, 2017.
- LAMB T. J. *et al.* Insights into the immunopathogenesis of malaria using mouse models. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 8, n. 6, 2006.
- LI, C.; SEIXAS, E.; LANGHORNE, J. Rodent malarial: the mouse as a model for understanding immune responses and pathology induced by the erythrocytic stages of the parasite. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 189, n. 3, p.115-126, 2001.
- LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas exóticas cultivadas**. 2 ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 223 p, 2008.
- MACHADO, D. R. A. Malária experimental por *Plasmodium chabaudi* linhagem CR em camundongo NOD/Uni (“Non-obese diabetic”)– Tese de doutorado, Universidade Estadual de Campinas, 2008.
- MALAGUARNERA, L.; MUSUMECI, S. The immune response to *Plasmodium falciparum* malária. **The Lancet. Infectious Diseases**, v. 2, p.472-478, 2002.
- MATTEELLI, A.; CASTELLI, F. **Chapter -2 Life cycle of malaria parasites**. disponível em [https://www.researchgate.net/publication/265620999\\_Chapter\\_-2\\_Life\\_cycle\\_of\\_malaria\\_parasites](https://www.researchgate.net/publication/265620999_Chapter_-2_Life_cycle_of_malaria_parasites). (2018)
- MENEGUETTI, D. U. O, *et al.* Antimalarial ethnopharmacology in the Brazilian Amazon. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 35, n. 4, 2014.
- MARQUES, L. C.; SOUZA, C. M. Pesquisa e desenvolvimento de fitoterápicos: Relatos de experiência em indústria farmacêutica nacional. **Revista Fitos Eletrônica**, v. 7, n. 01, 2013.
- MATTHEW, Shashank *et al.* Analgesic and anti-inflammatory activity of *Kalanchoe pinnata* (lam.) pers. **Journal of Medicinal Plants**, v. 1, n. 2, p. 24-28, 2013.
- MCGILVRAY, I.D.; SERGHIDES, L.; KAPUS, A. Non-opsonic monocyte/macrophage phagocytosis of *Plasmodium falciparum* parasited erythrocytes: a role for CD36 in malarial clearance. **Blood**, v. 96, p.3231-3240, 2000.
- MOHAN, S. C. *et al.* Antioxidant and phytochemical potential of medicinal plant *Kalanchoe pinnata*. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 3, n. 3, p. 881, 2012.
- MORSLED, A. *et al.* Evaluation of antinociceptive activity of two Bangladeshi medicinal plants, *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. and *Lagerstroemia speciosa* (L.) Pers. **Adv Nat Appl Sci**, v. 4, n. 2, p. 193-7, 2010.
- MOTA, M. L. **Atividade antimalárica de plantas medicinais da biorregião do Araripe-CE em modelo murino - *Plasmodium berghei***. 2009. 147 f. Dissertação

- (Mestrado em em Ciências Biológicas). Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2009.
- MOTTA, F. M. B. **A malária experimental por Plasmodium chabaudi chabaudi em camundongo SCID**. 2003. 60 f. Tese de doutorado. Universidade Estadual de Campinas, 2003.
- MOURÃO, R. H. V. *et al.* Antiinflammatory activity and acute toxicity (LD50) of the juice of *Kalanchoe brasiliensis* (comb.) leaves picked before and during blooming. **Phytotherapy Research**, v. 13, n. 4, p. 352-354, 1999.
- MUSOKE, A. J.; COX, H. W.; WILLIAMS, J. F. Experimental infection with *Plasmodium chabaudi* in rats: antigen and antibody associated with anemia and glomerulonephritis of acute infection. **The Journal of Parasitology**, v. 63, p. 1081-1088, 1977.
- MUZITANO, M. F. *et al.* The antileishmanial activity assessment of unusual flavonoids from *Kalanchoe pinnata*. **Phytochemistry**, v. 67, n. 18, p. 2071-2077, 2006.
- MUZITANO, M. F. *et al.* Influence of cultivation conditions, season of collection and extraction method on the content of antileishmanial flavonoids from *Kalanchoe pinnata*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 133, n. 1, p. 132-137, 2011.
- NAQVI, R. *et al.* Outcome in severe acute renal failure associated with malaria. **Nephrology, Dialysis, Transplantation**, v.18, p.1820–1823, 2003.
- NASCIMENTO, L. C.; GARDIN, N. E.; VOLKMANNI, P. R. *Bryophyllum calycinum* na terapêutica antroposófica, **Arte Médica Ampliada**, v. 34, n. 2, 2014.
- NAYAK, B. S.; MARSHALL, J. R.; ISITOR, G. Wound healing potential of ethanolic extract of *Kalanchoe pinnata* Lam. Leaf—a preliminary study. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 48, p. 572-576, 2010.
- NASCIMENTO, L. *et al.* Increased antioxidant activity and changes in phenolic profile of *Kalanchoe pinnata* (Lamarck) Persoon (Crassulaceae) specimens grown under supplemental blue light. **Photochemistry and photobiology**, v. 89, n. 2, p. 391-399, 2013.
- OKWU, D.E.; JOSIAH, C. Evaluation of the chemical composition of two Nigerian medicinal plants. **African Journal of Biotechnology**, v.5, n.4, p.357-361, 2006.
- OLUTAYO, T.; OMONKHUA, A.; AKANBI, O. Effects of *Anogeissus leiocarpus* on Haematological Parameters of Mice Infected with *Plasmodium berghei*. **Journal of Plant Studies**, v. 2, n. 2, p. 13-21, 2013.
- PATIL, S. B. *et al.* Antidiabetic activity of *Kalanchoe pinnata* in streptozotocin-induced diabetic rats by glucose independent insulin secretagogue action. **Pharmaceutical biology**, v. 51, n. 11, p. 1411-1418, 2013.
- PATTEWAR, S. V. *Kalanchoe pinnata*: Phytochemical and pharmacological profile. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 3, n. 4, p. 993, 2012.
- PINHEIRO, H. S, *et al.* Avaliação do desenvolvimento e da produção de flavonoides de *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. (Crassulaceae) em diferentes condições de luz e nutrição. **Revista Fitos Eletrônica**. v. 10, n. 4, 2016.
- PHATAK, R. S.; HENDRE, A. S. Total antioxidant capacity (TAC) of fresh leaves of *Kalanchoe pinnata*. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 2, n. 5, 2014.
- PRAKASH, J. *et al.* Acute renal failure in *Plasmodium vivax* malaria. **Journal-association of physicians of India**. v. 51, p.265-267, 2003.

- PRASAD, A. K. *et al.* Pharmacognostical, phytochemical and pharmacological review on *Bryophyllum pinnata*. **International Journal of Pharmaceutical & Biological Archive**, v. 3, n.3, p.423-433, 2012.
- QUEIROZ, N.L. Avaliação da resposta inflamatória cerebral em camundongos BALB/c e C57Bl/6 infectados por *Plasmodium berghei* cepa NK65 – Dissertação - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. 2007.
- REULING, I. J. *et al.* Liver Injury in Uncomplicated Malaria is an Overlooked Phenomenon: An Observational Study, **The Lancet**, v. 36, p.131-139, 2018.
- REY, L. **Parasitologia**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.
- RIDDER. S., *et al.* Artemisia annua as a self-reliant treatment for malaria in developing countries. **Journal of Ethnopharmacology**; v. 120; p. 302-314, 2008.
- RUPANI, A. B; AMARAPURKAR, A. D. Hepatic changes in fatal malaria: an emerging problem. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, n.103:2, 119-127. 2009.
- SACHETTI, C. G., *et al.* Avaliação da toxicidade aguda e potencial neurotóxico do óleo-resina de copaíba (*Copaifera reticulata* Ducke, Fabaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 4, p. 937-941, 2009.
- SAYA, R. P.; DEBABRATA, G.; SAYA, G. K. Malarial hepatopathy and Its Outcome in India. **National American Journal Medicine Science**. v. 4, n. 10, p.449–452, 2012.
- SCACCABAROZZI, D. *et al.* Differential induction of malaria liver pathology in mice infected with *Plasmodium chabaudi* AS or *Plasmodium berghei* NK65. **Malaria Journal**, v. 17, n. 1, p. 18, 2018.
- SCHRIER, R. W. **Diseases of the Kidney and Urinary Tract**, Lippincott Williams & Wilkins, 2007.
- SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE PÚBLICA DO PARÁ (SESPA), **Sespa elabora estratégias para reduzir os casos de malária** Disponível em <http://www.saude.pa.gov.br/2018/01/30/sespa-elabora-estrategias-para-reduzir-os-casos-de-malaria/> (2018)
- SHITLANI, D. *et al.* Ameliorative antimalarial effects of the combination of rutin and swertiamarin on malarial parasites. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 6, n. 6, p. 453-459, 2016.
- SILVA, H. S. R. C. **Antimaláricos potenciais: pró-fármacos poliméricos e formas de liberação controlada de artemisinina**. Tese de Doutorado em Insumos Farmacêuticos - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.
- SILVA JÚNIOR, *et al.* Kidney involvement in malaria: an update, **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57, e53, 2017.
- SILVA-NUNES, M. *et al.* Amazonian malaria: asymptomatic human reservoirs, diagnostic challenges, environmentally driven changes in mosquito vector populations, and the mandate for sustainable control strategies. **Acta Tropica**, v. 121, n.3, p. 281-291, 2012.
- SINDEN, R. E. Malaria, sexual development and transmission: retrospect and prospect. **Parasitology** v. 136, n. 12 p.1427-1434, 2009.
- SNOW, R.W.; TRAPE, J.F.; MARSH, K. The past, present and future of childhood malaria mortality in Africa. **Trends in Parasitology**, v. 17, n. 12, p. 593-597, 2001.
- SOMSAK, V. *et al.* Effect of Aqueous Crude Extract of *Tinospora Crispa* on *Plasmodium Berghei* Induced Liver Damage in Mice. **Malaria Control & Elimination**, v. 4, p. 127, 2015.

- SOUSA, J. R., *et al.* Situação da malária na Região do Baixo Amazonas, Estado do Pará, Brasil, de 2009 a 2013: um enfoque epidemiológico. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 6, n.4, p.39-47, 2015.
- SOUSA, P. J. C. *et al.* Estudo preliminar da atividade antiinflamatória de *Bryophillum calycinum* Salisb. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, p. 60-64, 2005.
- SOUZA, J. B.; RILEY, E. M. Cerebral malaria: the contribution of studies in animal models to our understanding of immunopathogenesis. **Microbes and Infection**, v. 4, n. 3, p. 291-300. 2002.
- STEVENSON M.M; RILEY E.M. Innate immunity to malaria. **Nature Reviews Immunology**. v. 4, n. 3, p.169-80, 2004.
- STRUIK, S.S.; RILEY, E.M. Does malaria suffer from lack of memory? **Immunology Reviews**, v. 201, p.268-290, 2004.
- SUEBSAENG, L., WERNSDORFER, W.H., ROONEY, W. Sensitivity to quinine and mefloquine of plasmodium falciparum in Thailand. **Bulletin of World Health Organization**, v. 64, p. 759-765, 1986.
- SU, Z.; STEVENSON, M.M. IL-12 Is Required for Antibody-Mediated Protective Immunity Against Blood-Stage *Plasmodium chabaudi* AS Malaria Infection in Mice. **Journal Immunology**, v. 168, p.1348-1355, 2001.
- SULISTYANINGSIHA, E.; AMALIA, T. Y.; KARTIKASARIA, R. Antioxidant and Antimalarial Activity of *Leea indica* leaf extract against Malaria-mice Model. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 7, p. 163-168, 2017.
- THIEN, H. V.; KAGER, P. A.; SAUERWEIN, H. P. Hypoglycemia in falciparum malaria: is fasting an unrecognized and insufficiently emphasized risk factor? **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 9, p. 410-415, 2006.
- TORRE, D., *et al.* Role of Th1 and Th2 cytokines in immune response to uncomplicated *Plasmodium falciparum* Malaria. **American Society for Microbiology**. v. 9, p. 348-351, 2002.
- TORRES-SANTOS, E. C. *et al.* Toxicological analysis and effectiveness of oral *Kalanchoe pinnata* on a human case of cutaneous leishmaniasis. **Phytotherapy Research**, v. 17, n. 7, p. 801-3, 2003.
- VAUGHAN, A. M.; ALY, A. S. I; KAPPE, S. H. I. Malaria parasite pre-erythrocytic stage infection: gliding and hiding. **Cell host & microbe**, v. 4, n. 3, p. 209-218, 2008
- VIEGAS J. R. C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.
- WETHERALL, D. J, *et al.* Malaria and the red cell. Hematology American Society Hematology Education Program. 2002.
- WICHAPOON, B. *et al.* Glomerular changes and alterations of zonula occludens-1 in the kidneys of Plasmodium falciparum malaria patients. **Malaria Journal**, v. 13, p.176, 2014.
- WHITE, N. J.; BREMAN, J. G. Malária, capítulo 248 em KASPER, D. *et al.* **Manual de Medicina de Harrison**. McGraw Hill Brasil, 2017.
- WILSON, M. L. Malaria rapid diagnostic tests. **Clinical infectious diseases**, v. 54, n. 11, p. 1637-1641, 2012.
- WILSON, W. R.; SANDE, M. **Doenças Infecciosas**. Artmed, Porto Alegre, 2004.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO Global Malaria Programme: World malaria report: 2011**. Geneva, 2011.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO Global Malaria Programme: World malaria report: 2012**. Geneva, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, WHO, **Severe falciparum malaria**, World Health Organization, Communicable Diseases Cluster. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 94:S1—90, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, WHO, **Malaria report 2017**. Geneva: World Health Organization; 2017

YADAV, N. P.; DIXIT, V. K. Hepatoprotective activity of leaves of *Kalanchoe pinnata* Pers. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 86, n. 2, p. 197-202, 2003.