



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

JEFFERSON CASTILHO MORAES

**ATIVIDADE ANTIPLASMÓDICA *IN VITRO* DOS ÓLEOS
ESSENCIAIS DE FOLHAS E GALHOS de *Piper marginatum***

Jacq. (PIPERACEAE)

**Santarém-Pará
Março/2018**

JEFFERSON CASTILHO MORAES

**ATIVIDADE ANTIPLASMÓDICA *IN VITRO* DOS ÓLEOS
ESSENCIAIS DE FOLHAS E GALHOS de *Piper marginatum***

Jacq. (PIPERACEAE)

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.

Orientadora: Profa. Dra. Kelly Christina Ferreira Castro

Co-orientador: Prof. Dr. Waldiney Pires Moraes

**Santarém-Pará
Março/2018**

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

M827a Moraes, Jefferson Castilho

Atividade antiplasmódica *In Vitro* dos óleos essenciais de folhas e galhos de *Piper marginatum* Jacq. (PIPERACEAE)./ Jefferson Castilho Moraes. – Santarém, 2018.

51 fls.: il.

Inclui bibliografias.

Orientadora: Kelly Christina Ferreira Castro

Coorientador: Waldiney Pires Moraes

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Oeste do Pará, Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação Tecnológica, Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Biociências.

1. *Piper marginatum*. 2. Óleo essencial. 3. Malária. I. Castro, Kelly Christina Ferreira Castro, *orient.* II. Waldiney Pires Moraes, *coorient.* III. Título.

CDD: 23 ed. 615.323

Bibliotecária - Documentalista: Renata Ferreira – CRB/2 1440

JEFFERSON CASTILHO MORAES

**ATIVIDADE ANTIPLASMÓDICA *IN VITRO* DOS ÓLEOS
ESSENCIAIS DE FOLHAS E GALHOS de *Piper marginatum*
Jacq. (PIPERACEAE)**

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.

Conceito:

Data de aprovação ___/___/___

Profa. Dra. Kelly Christina Ferreira Castro

Prof. Dr. Maxwell Barbosa de Santana

Prof. Dr. Bruno Alexandre da Silva

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por transcender seu cuidado misericordioso, presente na imagem dos familiares, amigos, mestres doutores e demais em todos os momentos. Agradeço a capacidade pelo resgate da autoconfiança e superação, de forma, especial a minha mãe M^a Iracilda Serrão Castilho e ao meu pai F^{co} Pires Moraes Filho, apoiando e estimulando para prosseguimento na vida.

A UFOPA, especialmente representada nas pessoas de Profa. Dra. Kelly Christina Ferreira Castro e Prof. Dr. Waldiney Pires Moraes, ao Laboratório de Farmacologia na pessoa de Dra. Tânia Mara Pires Moraes, ao Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento de Produtos Bioativos (P&DBIO), ao Laboratório de Bioquímica Medicinal (LBqM) da Universidade Federal de São João de Del-Rei/MG, representado nas pessoas de Dr. Fernando Varotti e Msc. Amanda Luisa da Fonseca e ao demais colaboradores que transcendendo suas habilidades e competências profissionais se fizeram amigos.

RESUMO

A malária é uma doença tropical, parasitária e considerada um dos maiores problemas de saúde, sociais e econômicos no mundo. Atualmente existe um grande arsenal terapêutico produzido a partir de produtos naturais e compostos sintéticos para o tratamento da malária. Dentre as principais drogas empregadas no tratamento destacam-se a cloroquina, a primaquina, a quinina, a mefloquina, a lumefantrina, a artemisinina e seus derivados, e alguns antibióticos como doxiciclina, clindamicina e tetraciclina. Com o aparecimento de parasitas resistentes, a falta de uma vacina eficaz, a grande endemicidade da malária e a biodiversidade da Amazônia como potencial fonte de novos fármacos, teve-se como objetivo avaliar o potencial farmacológico antimalárico de óleos essenciais de *Piper marginatum* Jacq. Folhas e galhos de *P. marginatum* foram coletadas em área localizada na Universidade Federal do Oeste do Pará, Unidade Tapajós, para posterior obtenção de óleos essenciais (OEs) via hidrodestilação. A caracterização química dos OEs foi realizada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. Para avaliação da atividade antimalárica, os óleos essenciais foram submetidos a testes esquizotomicidas *in vitro* com *Plasmodium falciparum* considerados microtestes tradicionais. Para investigação da citotoxicidade dos óleos essenciais de *P. marginatum* realizou-se ensaios utilizando o brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol (MTT), determinando assim a CL_{50} . O índice de seletividade dos OEs foi determinado através da razão da atividade citotóxica em relação à atividade antimalárica. Os OEs apresentaram na composição química 9,59% de monoterpenos, 75,35% de sesquiterpenos e 14,88% de fenilpropanóides para o OE obtido de galhos e 16,97% de monoterpenos; 45,22% de sesquiterpenos 1,98% de diterpenos, 24,82% de fenilpropanóides e 7,05% não identificados para o OE obtido de folhas. A CI_{50} do OE das folhas foi de 4,94 $\mu\text{g/mL}$ para cepas de *P. falciparum* sensível e CI_{50} de 5,14 $\mu\text{g/mL}$ para cepas cloroquinas resistentes. O OE dos galhos apresentou CI_{50} de 5,34 $\mu\text{g/mL}$ e 5,54 $\mu\text{g/mL}$ para cepas sensíveis e resistentes respectivamente. A avaliação da atividade antiplasmódica demonstrou que o OE das folhas apresentou melhor atividade quando comparado ao resultado do OE dos galhos frente ao *P. falciparum*.

Palavras-chave: *Piper marginatum*, óleo essencial, *Plasmodium falciparum*, atividade antiplasmódica.

ABSTRACT

Malaria is a tropical, parasitic disease and one of the biggest health, social and economic problems in the world. Currently there is a great therapeutic arsenal produced from natural products and synthetic compounds for the treatment of malaria. Among the main drugs used in the treatment are chloroquine, primaquine, quinine, mefloquine, lumefantrine, artemisinin and its derivatives, and some antibiotics such as doxycycline, clindamycin and tetracycline. With the emergence of resistant parasites, a lack of an effective vaccine, a great endemicity of malaria and a biodiversity of the Amazon as a potential source of new drugs, the objective was to evaluate the pharmacological antimalarial potential of essential oils of *Piper marginatum* Jacq. Leaves and branches of *P. marginatum* were collected in the area located at the Federal University of Western Para Tapajos Unit, for subsequent obtaining of essential oils (EOs) via hydrodistillation. The chemical characterization of EOs was performed by gas chromatography coupled to mass spectrometry. To evaluate the antimalarial activity, the essential oils were submitted to *in vitro* schizonticidal tests with *Plasmodium falciparum* considered traditional microtests. For the investigation of the cytotoxicity of the essential oils of *P. marginatum*, assays were performed using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazole (MTT) bromide, thereby determining LC50. The selectivity index of EOs was determined by the ratio of cytotoxic activity to antimalarial activity. The EOs presented in the chemical composition 9.59% of monoterpenes, 75.35% of sesquiterpenes and 14.88% of phenylpropanoids for the EO obtained from branches and 16.97% of monoterpenes; 45.22% sesquiterpenes 1.98% diterpenes, 24.82% phenylpropanoids and 7.05% unidentified for the EO obtained from leaves. The leaf EO IC 50 was 4.94 µg / mL for sensitive *P. falciparum* strains and IC 50 of 5.14 µg / mL for resistant chloroquine strains. The EO of the branches had IC 50 of 5.34 µg / mL and 5.54 µg / mL for sensitive and resistant strains, respectively. The evaluation of the antiplasmodic activity showed that the leaf EO presented better activity when compared to the EO result of the branches against *P. falciparum*.

Keywords: *Piper marginatum*, essential oil, *Plasmodium falciparum*, antiplasmodic activity

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Distribuição epidemiológica mundial da malária	11
Figura 2- Fêmea do anofelino adulto.....	13
Figura 3-Criadouros	14
Figura 4-Ciclo biológico do Plasmodium falciparum e modo de transmissão.....	15
Figura 5-Piper marginatum.....	23
Figura 6-Fluxograma da metodologia.....	27
Figura 7- Avaliação da parasitemia de cepas de <i>P. falciparum</i> cloroquina sensível (3D7)	36
Figura 8- Avaliação da parasitemia de cepas de <i>P. falciparum</i> cloroquina resistente (W2)	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais drogas antimaláricas e ação específica nas formas evolutivas de <i>Plasmodium</i>	17
Tabela 2: Resultados <i>in vitro</i> para a atividade antiplasmodica (CI ₅₀) dos óleos de <i>P. marginatum</i> contra as cepas 3D7 de <i>P. falciparum</i>	34
Tabela 3: Resultados <i>in vitro</i> para a atividade antiplasmodica (CI ₅₀) dos óleos de <i>P. marginatum</i> contra as cepas W2 de <i>P. falciparum</i>	35
Tabela 4: Ensaio <i>in vitro</i> de citotoxicidade dos óleos essenciais de folhas e galhos de <i>P. marginatum</i>	37
Tabela 5: Índice de seletividade dos óleos essenciais de folhas e galhos de <i>P. marginatum</i> para cepas de <i>P. falciparum</i>	38
Tabela 6: composição química do óleo essencial de galhos de <i>P. marginatum</i> destacando como componentes majoritários (*) aqueles acima de 5%.	39
Tabela 7: Composição química do óleo essencial de folhas de <i>P. marginatum</i> destacando como componentes majoritários (*) aqueles acima de 5%	40

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

OMS	Organização Mundial de Saúde
ELISA	Ensaio imunoenzimático
CI ₅₀	Concentração inibitória de 50% no crescimento da população do parasito
P&DBIO	Pesquisa e Desenvolvimento de Produtos Bioativos
DMSO	dimetilsulfóxido
OE	leo Essencial
CO ₂	dióxido de carbono
O ₂	oxignio
µg/mL	microgramas por mililitro
UFOPA	Universidade Federal do Oeste do Pará.
C	graus Celsius
%	por cento
pH	potencial hidrogeniônico
µL	microlitros
DBO	Demanda Bioquímica de Oxignio
IS	ndice de seletividade
LC ₅₀	Concentração Letal para 50% das populações de células
RPM	Rotação por minuto
v/v	Volume por Volume
mM	milimolar
MTT	Brometo 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol
IS	ndice de Seletividade

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1 MALÁRIA.....	12
2.1.1 Transmissão e ciclo biológico	13
2.1.2 Diagnóstico, tratamento e complicações	16
2.1.3 Resistência aos antimaláricos e imunoproteção	19
2.2 PRODUTOS NATURAIS COM AÇÃO ANTIMALÁRICA	22
2.3 O GÊNERO <i>PIPER</i> E A MEDICINA POPULAR	22
2.4 <i>PIPER MAGINATUM</i> JACQ.	23
3 JUSTIFICATIVA	25
4 OBJETIVOS	26
4.1 GERAL	26
4.2 ESPECÍFICO.....	26
5 MATERIAL E MÉTODOS	27
5.1 MATERIAL BOTÂNICO	27
5.2 PREPARO E AQUISIÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>P. MARGINATUM</i>	28
5.3 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>P. MARGINATUM</i> ..	28
5.4 CULTIVO <i>IN VITRO</i> DAS FASES INTRARITROCITÁRIAS DE <i>P. FALCIPARUM</i>	29
5.5 SINCRONIZAÇÃO DO CULTIVO DE <i>P. FALCIPARUM</i>	29
5.6 TESTES ESQUIZONTICIDAS <i>IN VITRO</i> COM <i>P. FALCIPARUM</i> UTILIZANDO O MICROTESTE TRADICIONAL	29
5.7 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE.....	30
5.7.1 Cultivo de linhagens celulares	30
5.7.2 Teste MTT (3-(4,5dimetiltiazol-2il)-2,5 difeniltetrazolico)	31
5.8 ÍNDICE DE SELETIVIDADE (IS).....	32
5.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	32
5.10 DROGAS E SOLUÇÕES.	32
6 RESULTADOS	34
6.1 RENDIMENTO DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS E GALHOS.....	34
6.2 ATIVIDADE ANTIPLASMÓDICA	34
6.3 VIABILIDADE CELULAR	37
6.4 ÍNDICE DE SELETIVIDADE (IS).....	38
6.4 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>P. MARGINATUM</i>	38
7 DISCUSSÃO	42
8. CONCLUSÃO	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

1 INTRODUÇÃO

A malária é uma doença tropical e parasitária, considerada um dos maiores problemas sociais e econômicos no mundo. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS, 2015), a mortalidade associada à doença está estimada em um milhão de mortes a cada ano. É conhecida também como paludismo e febre terçã, deixando em risco quase metade da população mundial com ocorrência em 97 países (OMS, 2015). Está presente, principalmente, nos países em desenvolvimento, concentrando-se nas Américas, Sudeste Asiático e África Central, sendo que o maior foco da doença está no continente africano, onde ocorre mais de 90% dos casos (BRASIL, 2013).

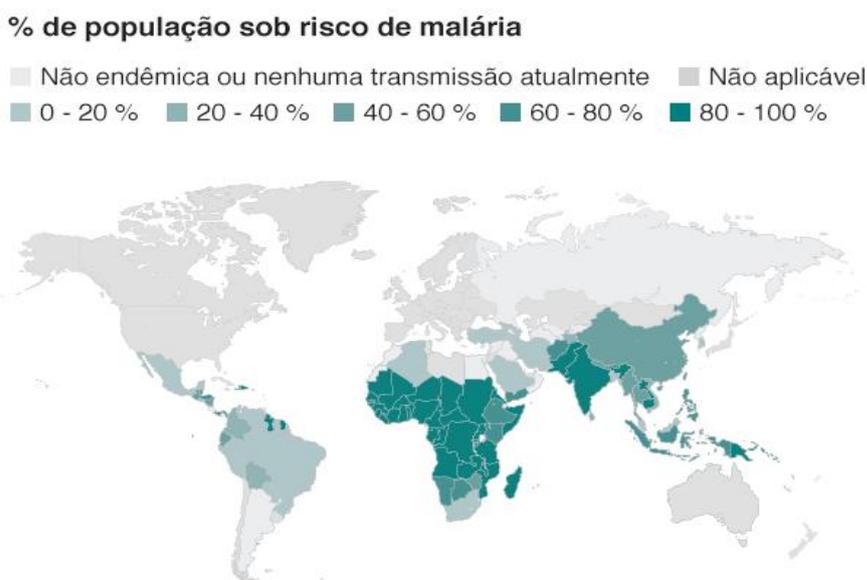


Figura 1- Distribuição epidemiológica mundial da malária
Fonte: (OMS, 2015)

Nos países em desenvolvimento, o uso de plantas medicinais para o tratamento de muitas doenças torna-se uma alternativa diante da escassez de medicamentos industrializados e do difícil acesso a algumas regiões. De acordo com a OMS, 80% da população mundial usam as plantas para dar assistência à saúde, destacando que 85% da medicina popular utilizam as plantas e seus extratos vegetais. Na região amazônica, a utilização de plantas medicinais tem uma forte influência das populações tradicionais e pelas condições socioeconômicas, principalmente das populações do campo, das florestas e dos rios, tornando-se o principal recurso para o tratamento de diversas doenças.

Entre as espécies de plantas utilizadas empiricamente, a *Piper marginatum* Jacq. conhecida popularmente no nordeste como malvaísco e na região norte como caapeba cheirosa ou pimenta do mato, é utilizada amplamente na medicina popular para tratamento da inflamação, picadas de cobras e doenças hepáticas (VAN DER BERG, 1982; MAXWELL E RAMPERSAD, 1988; D'ANGELO et al., 1997). Na culinária, os frutos são adicionados aos alimentos substituindo a pimenta preta (BRAGA, 2001).

A resistência dos parasitos aos medicamentos antimaláricos é um problema mundial exigindo a pesquisa constante de fármacos mais potentes, e as plantas com sua enorme produção de metabólitos secundários apresentam-se como fonte de compostos bioativos (KRETLI, 2008).

Considerando a malária uma das doenças negligenciadas, e ainda o potencial da biodiversidade de nossa região, este projeto tem por objetivo avaliar o efeito antimalárico e a toxicidade aguda, *in vitro*, do óleo essencial de *P. marginatum* de Santarém – Pará

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 MALÁRIA

A malária é uma doença infecciosa febril aguda, cujos agentes etiológicos são protozoários transmitidos por vetores. Chegou à América através de colonizadores europeus que trouxeram consigo as espécies *Plasmodium malariae* e *Plasmodium vivax*. Já a espécie *Plasmodium falciparum*, surgiu em decorrência da importação de escravos do continente africano para o americano (LEITE et al., 2013).

Hipócrates, o pai da medicina, em 400 a.C. foi o pioneiro em descrever as febres intermitentes da malária, associando a doença com as condições do meio ambiente, destacando que os registrados de febre ocorriam em regiões pantanosas. O médico militar Charles Louis Alphonse Laveran (1845-1922), conseguiu durante os estágios intensos de febre da malária, caracterizar os parasitas presentes no sangue de pacientes e em 1880 denominou os organismos de *Oscillaria malariae* (CAPANA, 2006).

O quadro clínico da malária é caracterizado por febre alta, acompanhada de calafrios, sudorese profusa e cefaleia, que ocorrem em padrões cíclicos,

dependendo da espécie de plasmódio infectante (BRASIL, 2010b, p. 12). O ataque paroxístico inicia-se com calafrio, acompanhado de tremor generalizado, com duração de 15 minutos a 1 hora. Na fase febril, a temperatura pode atingir 41°C. A fase de remissão caracteriza-se pelo declínio da temperatura (fase de apirexia). Novos episódios de febre podem acontecer em um mesmo dia ou com intervalos variáveis, caracterizando um estado de febre intermitente. O período de incubação varia de acordo com a espécie de plasmódio: Para *P. falciparum*, de 8 a 12 dias; *P. vivax*, de 13 a 17 dias; *P. malariae*, de 18 a 30 dias (BRASIL, 2010a, p.297).

2.1.1 Transmissão e ciclo biológico

O Modo de transmissão ocorre através da picada da fêmea do mosquito *Anopheles*, infectada pelo *Plasmodium*, que geralmente ocorre ao entardecer e ao amanhecer. As principais espécies vetoras no Brasil são *A. darlingi*, *A. aquasalis*, *A. cruzi* e *A. bellator* (BRASIL, 2010a, p. 297). Os insetos transmissores da malária são da ordem Diptera, da família Culicidae e do gênero *Anopheles*. Os mosquitos anofelinos medem cerca de um centímetro de comprimento, apresenta corpo delgado, longas pernas, asas manchadas de escamas claras e escuras, em algumas regiões do Brasil são conhecidos como mosquito prego.



Figura 2- Fêmea do anofelino adulto
Fonte: (BRASIL, 2006)

Como uma espécie nativa, o *Anopholes*, tem como criadouros grandes acúmulos de água limpa ensolarada, caracterizados por remansos de rios, lagoas e brejos, apesar de sua preferência em picar perto de seu criadouro, conseguem voar dois a três quilômetros para exercer a hematofagia. A atividade dos insetos está

relacionada com fatores ambientais, aumentando de acordo com a temperatura, em cerca de 30°C e umidade entre 40 e 80% (BRASIL, 2010b, p. 10).



Figura 3-Criadouros
Fonte: (BRASIL, 2006)

O parasito responsável pela malária pertence ao filo Apicomplexa, subordem haemosporina e família *Plasmodiidae*. Existem quase 100 espécies de plasmódios e destas 22 infectam macacos e 50 parasitam aves ou répteis, no entanto somente quatro parasitam o homem: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* e o *Plasmodium ovale* (BRASIL, 2010b, p. 10).

O ciclo biológico caracteriza-se como heteróxico, ocorrendo em dois hospedeiros: no mosquito acontece o ciclo sexuado, sendo o hospedeiro definitivo e em humanos acontece o ciclo assexuado, considerado assim hospedeiro intermediário. Durante o ciclo o parasita apresenta variadas formas de desenvolvimento, caracterizando-se como esporozoítas (forma infectante), trofozoítas, esquizontes, merozoítas, microgametas, macrogametas e oocisto (HAHN & POTTINGER, 2016).

(gameta feminino) originando ao ovo ou zigoto na luz do estômago. Após a fecundação inicia a esporogonia (meiose) produzindo milhares de esporozoítos que através da hemolinfa se dirigem as glândulas salivares do inseto e durante a hematofagia inocula esporozoítos em novos hospedeiros (YAMAMOTO et al., 2016).

2.1.2 Diagnóstico, tratamento e complicações

No diagnóstico da malária deve-se levar em consideração o contexto epidemiológico, clínico e laboratorial. É necessária a realização de anamnese para investigar se o indivíduo reside em área endêmica ou se esteve temporariamente em zona de risco, assim como histórias de transfusões sanguíneas ou padrões de febre intermitente (KOOGAN, 2011).

O método mais seguro e amplamente utilizado é o laboratorial, que utiliza a microscopia da gota espessa, coletada da punção digital e corada pelo método de Walker, para identificação do parasita. Através da microscopia da gota é possível detectar a densidade parasitária por ml de sangue, estabelecendo o nível de parasitemia e também permitindo a diferenciação das espécies de *Plasmodium*, assim como as formas evolutivas presentes no sangue circulante (BRASIL, 2010^a, p. 298).

Outro método utilizado são os testes imunológicos, que identificam os antígenos dos parasitos por anticorpos monoclonais, através da metodologia imunocromatográfica. Muitos kits comerciais já estão disponíveis e possibilitam um diagnóstico, em torno de 15 a 20 minutos (BRASIL, 2010a, p. 298). A proteína II rica em histidina (HRP2) é um dos antígenos-alvo dos testes, pois são produzidas pelos trofozoítos e gametócitos jovens de *P. falciparum*. A desidrogenase láctica (pLDH) produzidas pelas formas assexuadas e sexuadas dos parasitas também é alvo dos testes que identificam as quatro espécies de *plasmodium* que infectam humanos. São métodos diagnósticos de rápida execução e fácil interpretação, não necessitando de microscópio. No entanto apresentam pouca sensibilidade para baixa infecção, pode dar resultados positivos em pacientes recentemente curados, não detectam infecções mistas e seu custo ainda é elevado quando comparado ao da microscopia (BRASIL, 2010a).

Novas técnicas estão sendo implementadas com a fixação de corante acridina-orange ao DNA e RNA do parasito. Dentre as principais como QBC

(Revestimento Buffy Quantitativo) caracteriza-se em coletar amostra de sangue, colocando em tudo capilar heparinizado com corante no seu interior. Após a centrifugação, o corante incorpora o material genético do parasita e as hemácias contaminadas são separadas. Apesar de sua sensibilidade a técnica não permite a distinção das espécies e a necessidade de insumos torna o custo elevado para aplicação (KOOGAN, 2011).

O tratamento da malária baseia-se de acordo com a espécie de *plasmodium*, idade do paciente, exposição anterior a infecção e gravidez. A terapia tem por objetivo atingir o parasito em pontos estratégicos do ciclo evolutivo, como as formas esquizontílicas sanguíneas, formas latentes teciduais (hipnozoítos) e formas sexuadas (gametócitos).

Atualmente existe um arsenal terapêutico produzido a partir de produtos naturais e compostos sintéticos, classificados de acordo com seu modo de ação. Dentre as principais drogas utilizadas para o tratamento da malária destaca-se a família das quinolinas formadas pelas 4- aminoquinolinas, as 8-aminoquinolinas e os álcoois quinolínicos que incluem drogas como a cloroquina, primaquina, quinina, mefloquina, lumefantrina (tabela 1) (BRASIL, 2010a, p. 299 - 308). Além destes a artemisinina e seus derivados, e alguns antibióticos como doxiciclina, clindamicina e tetraciclina também são empregados como drogas antimaláricas atuando em diferentes formas do parasita.

Tabela 1: Principais drogas antimaláricas e ação específica nas formas evolutivas de *Plasmodium*.

Drogas antimaláricas	Ação nas formas evolutivas
Cloroquina	Trofozoítos, esquizontes e merozoítos sanguíneos.
Primaquina	Esquizontes hepáticos e gametócitos.
Quinina e mefloquina	Trofozoítos, esquizontes e merozoítos sanguíneos
Artemisinina e Lumefantrina	Formas sanguíneas de <i>P. falciparum</i> resistentes

Fonte: Jefferson Castilho Moraes

A cloroquina atua eliminando as formas sanguíneas da maioria dos plasmódios, no entanto não tem efetividade sobre os gametócitos do *P. falciparum*, foi o antimalárico mais eficaz e mais utilizado, sendo usado como formas profiláticas em regiões endêmicas, apresentando poucos efeitos colaterais. No entanto, o uso

para profilaxia causou a resistência que hoje é encontrada em todo mundo (GREGSON & PLOWE, 2005). A primaquina age contra as formas esquizontílicas hepáticas e gametócitos.

A quinina e a mefloquina atuam eliminando os trofozoítos, esquizontes e merozoítos sanguíneos, não exercendo ação em formas teciduais, como hipnozoítos (NEVES, 2009). Originado da casca da *Cinchona ledgeriana* a quinina foi antimalárico mais usado no século passado e sua utilização só diminuiu devido a sua elevada toxicidade e surgimento de estirpes resistentes de *P. falciparum*. A lumefantrina é usada em associação com arteméter atuando sobre as formas sanguíneas dos plasmódios (KOOGAN, 2011).

A mefloquina atualmente é uma alternativa utilizada para o tratamento de *P. falciparum* resistente a cloroquina. Comparada a outros antimaláricos, a quantidade da dose de mefloquina é muito menor a ser administrada, no entanto, pode manifestar efeitos colaterais gastrointestinais, tonturas e alguns efeitos psicológicos que restringe o uso para pessoas com históricos de epilepsia (TANOS et al, 2008).

Ainda não é totalmente compreendido o mecanismo de ação das quinolinas, mas infere-se que essas drogas atuam interferindo o metabolismo de glicose dificultando a digestão da hemoglobina (KOOGAN, 2011). Acredita-se que os fármacos ligam-se diretamente ao grupo da hemoglobina; realizam a inibição da enzima ferriprotoporfirina-IX polimerase; inibem a fosfolipase vacuolar e se interagem com DNA.

No entanto, o principal mecanismo de ação das quinolinas aponta para formação de acúmulos de bases fracas no lisossomo ácido do parasita e a ligação das drogas à ferriprotoporfirina-IX (grupo heme da hemoglobina), impedindo dessa forma, a quebra da substância pela enzima ferriprotoporfirina-IX, interrompendo o mecanismo pelo qual o parasita transforma ferriprotoporfirina-IX, um subproduto tóxico da digestão da hemoglobina, em hemozoína não tóxico. Assim o acúmulo de ferriprotoporfirina-IX dentro dos vacúolos do parasita, os causa à morte (ROBERT et al., 2001; SILVA et al., 2005).

O mecanismo de ação da artemisinina é semelhante ao das quinolinas. Muitos estudos relatam que a ligação endoperóxido da artemisinina é quebrada pelo íon Fe^{2+} do grupo heme, liberando radicais livres e impedindo a desintoxicação do heme dentro dos vacúolos dos parasitas (DING et al, 2011). Os compostos de

artemisinina apresentam poucos efeitos adversos, mas a diarreia, dor abdominal e náuseas são os que mais se manifestam (GOMES et al, 2011).

A malária pode desencadear complicações acometendo vários órgãos e desenvolver a forma grave da doença, comprometendo o sistema nervoso central, circulatório e renal. Apesar da maioria dos casos de malária grave ser ocasionada pelo *P. falciparum*, a infecção causada por *P. vivax*, também pode desenvolver formas graves da doença como malária cerebral, anemia grave, insuficiência renal e respiratória (KOOGAN, 2005 & WHO, 2010).

A malária cerebral em sua maioria acomete indivíduos infectados por *P. falciparum*, desenvolvendo-se clinicamente da malária grave que em sua maioria causa óbito (ALVES et al, 2007). O quadro clínico apresenta-se com episódios de convulsões evoluindo para o coma em indivíduos diagnosticados que não apresentem outras encefalopatias. Acredita-se que a fisiopatologia da malária cerebral ao acometimento das hemácias levando a sua agregação e obstrução de vasos, causando assim a hipóxia (MUTIS et al, 2005).

A anemia grave é uma das principais complicações imediata da malária devido a invasão e destruição dos eritrócitos pelos parasitos. Um hematócrito com valor menor que 15 % e hemoglobina abaixo de 5 g/dl é referência para o diagnóstico (HALDAR, 2009).

Outra complicação comum da malária grave causada por *P. falciparum* é a insuficiência renal, desencadeada por alterações tubulares. As hemácias infectadas manifestam fatores fisiopatogênicos levando ao aumento sérico de creatinina e uréia. O fenômeno da citoaderência e a deformidade das hemácias culminam na redução do fluxo sanguíneo sistêmico e conseqüente isquemia renal (DONDORP et al., 2008).

2.1.3 Resistência aos antimaláricos e imunoproteção

A resistência quimioterápica dos parasitas, em especial do *P. falciparum*, ocorre devido a capacidade de desenvolvimento da espécie sobre pressão dos fármacos (HASTINGS & DONNELLY, 2005). Os primeiros relatos de plasmódios resistentes a quimioterapia ocorreu no Brasil em 1910, porém os registros de cepas de *P. falciparum* resistentes a cloroquina se deu no sudeste asiático e na América do sul no final dos anos 50, depois a partir da década de 60 os registros de *P.*

falciparum resistentes chegaram ao Brasil, a Venezuela, ao Panamá, a Colômbia e ao Peru (GUERIN et al, 2000; KOOGAN, 2011).

A principal causa de resistência é devido a mutações espontâneas, pois estudos demonstram que a utilização de antipalúdicos não exerce efeitos mutagênicos sobre os plasmódios. No entanto o uso de medicamentos exerce uma pressão seletiva sobre estirpes de parasitas sensíveis e de parasitas resistentes, eliminando assim os mais sensíveis (KOOGAN, 2011). Além disso, a administração inadequada e a baixa qualidade de fármacos colaboram de forma significativa para o surgimento de resistência (MULLER, 2011).

O parasita resistente origina-se de descendentes primitivos sensíveis a droga, mostrando-se estáveis geneticamente e permitindo sua agregação e recombinação apenas no hospedeiro definitivo (mosquito), onde ocorre a fase sexuada do parasito, logo, infere-se que as mutações gênicas acontecem a nível nucleares e sem a influências de drogas antimaláricas. Em estudos do mapa genético de *P. falciparum*, já foram encontrados três genes relacionados a resistência a cloroquina. (KOOGAN, 2011).

Os compostos derivados de artemisinina apresentam-se hoje como referência para os tratamentos de *P. falciparum* resistente em todo o mundo, no entanto já existem relatos de casos resistentes a esses compostos em províncias da China. Além disso, a espécie de *P. vivax* também tem registros de resistência a cloroquina no Brasil, em regiões da Ásia e da Oceania. Hoje cepas dos parasitas com características resistentes estão distribuídas nas regiões endêmicas de todo mundo, tornando-se um dos maiores problemas no controle da epidemia malárica.

Estudos com novas tecnologias vêm sendo realizados na tentativa de controlar ou erradicar a malária. O desenvolvimento de uma vacina que garanta imunidade a doença é alvo de grande importância para os pesquisadores, uma vez que a resistência a terapêutica dos parasitas aumenta a cada dia. Na atualidade a vacina mais avançada é a RTS,S/AS01 (Mosquirix®), atuando contra as formas pré-eritrocíticas do *P. falciparum*, baseando-se na principal proteína presente na superfície dos esporozoítas que apresentam epítomos conhecidos de células B e T (KEITANY, VIGNALI, & WANG, 2014).

A pesquisa vem sendo desenvolvida pela iniciativa privada da indústria farmacêutica Glaxo Smithe Kline conjuntamente com a Fundação Bill e Melinda Gate. Atualmente encontra-se em fase III de desenvolvimento no qual realizou um

ensaio randomizado cego, em países da África subsaariana, com lactentes e crianças. As crianças foram distribuídas em grupos com idade de 5 a 17 meses e grupos com 6 a 12 semanas de idade, para receber três doses da vacina contra a malária, ou quatro doses de uma vacina comparativa. O ensaio durou quatro anos e a proteção contra todos os episódios de malária foi de 28% no grupo que recebeu três doses e 36% no grupo das quatro doses. Após 32 meses a eficácia dos participantes do grupo de três doses apresentou-se insignificante e no grupo de quatro doses houve uma baixa na eficácia, mas permaneceu significativa até o final do seguimento (KEITANY, VIGNALI, & WANG, 2014).

Apesar dos avanços da RTS,S, não se conseguiu produzir anticorpos com memória permanentes para a proteção contínua e erradicação da malária. As pesquisas continuam com novas expectativas em empregos de anticorpos monoclonais (AcM) que se mostram eficientes para a identificação de epítomos e mecanismos, com sua especificidade para as formas sanguíneas assexuadas demonstram efeitos neutralizantes, no entanto a forma de obtenção limita o experimento a estudos *in vitro* (FRASSON et al., 2009).

Outra técnica para o desenvolvimento de anticorpos recombinantes humanos é a utilização de bibliotecas genômicas que permite a criação de anticorpos monoclonais específicos para *P. falciparum*, podendo adequar-se a modelos *in vitro* e *in vivo*. A tecnologia ainda permite ajustes moleculares para especificidade aos antígenos e adequação funcionais dos anticorpos (HVIID; BARFOD, 2008).

A vacina contra malária não é uma realidade distante, mas ainda é um grande desafio para os pesquisadores, pois é necessário o conhecimento da complexa interação hospedeiro e parasita e de metodologias de estudos *in vivo* que permitam o desenvolvimento de imunidades para o *Plasmodium*.

2.2 PRODUTOS NATURAIS COM AÇÃO ANTIMALÁRICA

A malária vem sendo amplamente controlada através do uso da medicina tradicional. Cerca de 50% dos pacientes com malária no mundo utilizam as plantas medicinais no tratamento da doença (WILLCOX e BODEKER, 2004). Nos países africanos, 80% da população usam medicina tradicional como primeira escolha no tratamento da malária (DEHARO e GINSBURG, 2011).

Estudos registram o uso de mais de 1.200 espécies de plantas para o tratamento da malária e de suas febres em todo o mundo (WILLCOX e BODOKER, 2004). Mariath et al. (2009) realizou um levantamento de 476 espécies utilizadas no continente americano e identificaram que 198 foram ativas para alguma espécie de *Plasmodium* da malária. Na região Amazônica, Souza et al. (2017), observou que o óleo-resina da *Copaifera reticulata* apresentou atividade antipalúdica causada pelo *P. falciparum* resistente.

A pesquisadora chinesa Youyou Tu em conjunto com os grupos de pesquisa das áreas de fotoquímica e farmacologia, norteou e liderou as pesquisas da planta *Artemisia annua*. No desenvolvimento de sua pesquisa, Tu reajustou o método para obtenção do extrato da planta com o intuito de obter um produto mais ativo; após a modificação do método descobriu que a substância apresentava uma extraordinária e eficaz atividade antimalárica (OWENS, 2015). Hoje a artemisina é referência mundial no tratamento da malária causada pelo *P. falciparum* resistente, reduzindo as mortalidades em aproximadamente 100 mil mortes por ano nas áreas endêmicas de vários países, com destaque na África onde o número de casos da doença é alarmante. Os resultados da pesquisa da chinesa Youyou Tu foram tão eficazes que a levaram a ganhar o prêmio Nobel de Medicina de 2015 (OWENS, 2015).

2.3 O GÊNERO *Piper* E A MEDICINA POPULAR

O Gênero *Piper* pertence à família da Piperaceae, uma das maiores angiospermas, com distribuição pantropical e diversidade localizada nas Américas Central e do Sul (UNCKER 1958, JARAMILLO & MANOS 2001, MEDEIROS & GUIMARÃES 2007). Com aproximadamente 2500 espécies, abrange cinco gêneros dos quais *Piper* L. e *Peperomia* Ruiz & Pav. são os de maior diversidade.

O Brasil apresenta aproximadamente 500 espécies distribuídas nos gêneros *Piper*, *Peperomia* e *Manekia* Trel. (TEBBS 1989, JARAMILLO & MANOS 2001, ARIAS et al. 2006).

As espécies do gênero *Piper* vêm sendo estudadas em busca de produtos naturais que apresentem atividades antitumorais, antimicrobianas, antifúngicas e inseticidas. As folhas de diferentes espécies de *Piper* são utilizadas na medicina popular de países tropicais e subtropicais da América do Sul, como é o caso da *P. carpunya*, empregada no tratamento de reações inflamatórias, úlceras, diarreias, doenças infecciosas e parasitárias de pele (QUILEZ, 2010).

As folhas de *P. ovatum* são conhecidas na medicina popular por seu efeito anestésico no tratamento de doenças inflamatórias, e as folhas de *P. sarmentosum* são utilizadas pelos malaios para tratar dores de cabeça, dores de dente, tosse asma e febre (ZAKARIA et al., 2010).

2.4 *Piper marginatum* JACQ.

As espécies de *Piper* se apresentam como pequenos arbustos ou árvores sublenhosas caracterizadas pela presença de nós foliares geniculados, folhas de base assimétrica e presença de espigas de flores sésseis opostas as folhas (SOUZA & LORENZI, 2005).



Figura 5-*Piper marginatum*
Foto: Jefferson Castilho Moraes

É uma espécie de planta encontrada na América do Sul, América Central, Antilhas e Brasil, onde na Região Norte apresenta-se nos estados do Acre, Amazonas, Amapá, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins (GUIMARÃES et al, 2016). As espécies de *Piper* em sua maioria habitam lugares úmidos, quentes e regiões de várzeas de florestas tropicais, fazendo parte de uma vegetação conhecida como pioneira (KATO; FURLAN, 2007; SANTOS et al., 2001).

Estudos com a espécie *Piper marginatum*, como o de Silva e Bastos (2007) e Sanchez et al. (2011) demonstram que óleo essencial da folha da *P. marginatum* apresentara atividade antimicrobiana em diferentes espécies de fungos e bactérias. Já pesquisas realizadas por Autran et al. (2008) revelaram que o óleo essencial de *P. marginatum* apresenta uma potente atividade larvicida contra o *Aedes aegypti*. Araújo et al. (2014), e Reigada et al. (2007), obtiveram uma atividade antimicrobiana utilizando o extrato da folha de *P. marginatum*.

O óleo essencial de folhas de *P. marginatum* apresentam compostos provenientes de metabolismo secundário como monoterpenoides, sesquiterpenoides e fenilpropanóides (BRU et al., 2016). Em estudos realizados com uma espécie de *P. marginatum* coletada em recife, Autran et al. (2009) demonstrou que o componente principal do óleo essencial da folha é o Z-asarona, no óleo essencial dos galhos é o E-arasona e no óleo essencial da inflorescência é o patchoulol.

Cerca de 25 monoterpenos e 57 sesquiterpenos já foram identificados em estudos fitoquímicos com *P. marginatum*, em sua maioria utilizando o óleo essencial da planta de diferentes locais e em condições e períodos diferentes (ANDRADE et al., 2008).

No banco de dados consultados até a finalização do estudo não se encontrou relatos referente a atividade antimalárica de óleo essencial de folhas e galhos de *P. marginatum*.

3 JUSTIFICATIVA

Segundo a OMS a malária é uma doença parasitária de grande importância epidemiológica, considerada um problema grave de saúde pública (WHO, 2010). No Brasil, dados do Ministério da Saúde demonstram que o número de casos da doença foi de aproximadamente a 200.000 no ano de 2011 e desses 99,9% foram originados nos Estados da Amazônia Legal (BRASIL, 2011).

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 (MILLER et al., 2013).

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.

As plantas representam uma fonte importante para a pesquisa de novos princípios ativos para o tratamento da malária; várias plantas já foram citadas com esta propriedade, mas poucas destas foram efetivamente testadas e por isso são necessárias pesquisas multidisciplinares e interdisciplinares na busca de novos remédios antimaláricos (MARIATH et al., 2009). Neste contexto, a triagem de novos compostos com ação antimalárica ainda se configura como uma ferramenta útil no combate frente as cepas de *Plasmodium* resistentes.

4 OBJETIVOS

4.1 GERAL

Avaliar o potencial antiplasmódico do óleo essencial de *P. marginatum*.

4.2 ESPECÍFICO

- Caracterizar quimicamente por CG-EM o óleo essencial de folhas e galhos de *P. marginatum*;
- Investigar a citotoxicidade dos óleos essenciais de folhas e galhos de *P. marginatum* em culturas de células;
- Avaliar a atividade antiplasmódica *in vitro* dos óleos essenciais de *P. marginatum* em estirpe de *P. falciparum* sensível e resistente a cloroquina;
- Determinar o índice de seletividade dos óleos essenciais de *P. marginatum*.

5 MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi desenvolvida por meio experimental, no qual foi executado de acordo com o seguinte fluxograma (Figura 6):

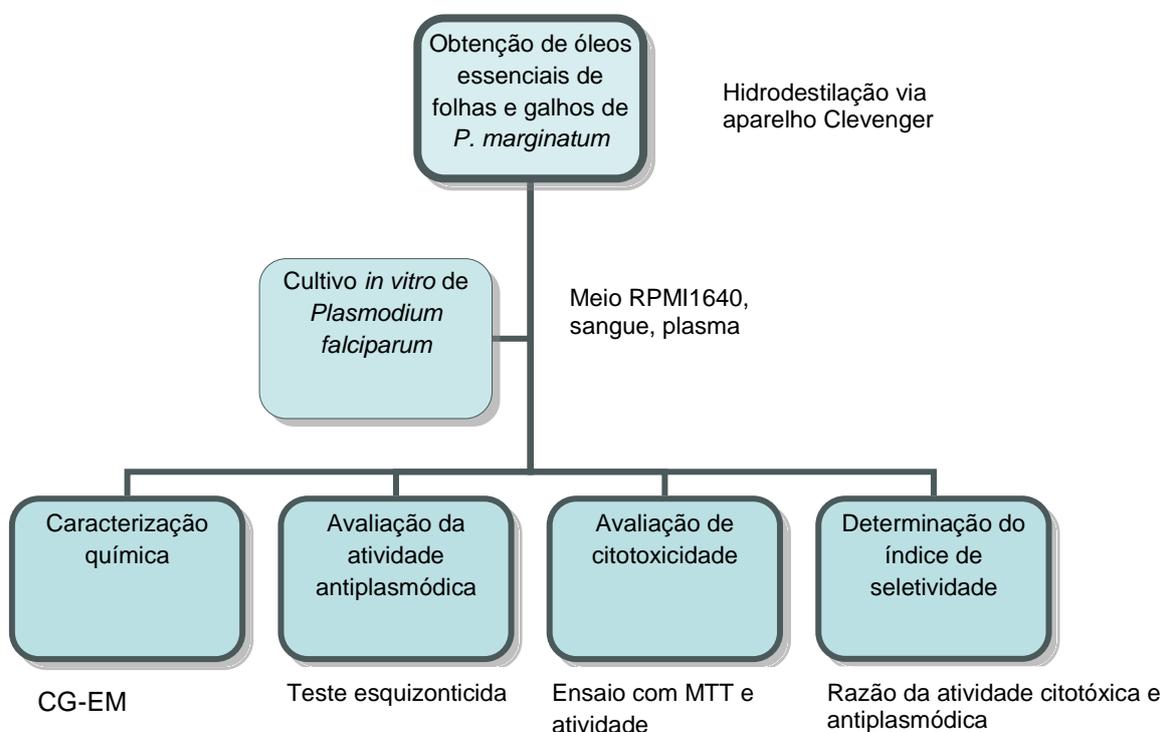


Figura 6-Fluxograma da metodologia
Fonte: Jefferson Castilho Moraes

5.1 MATERIAL BOTÂNICO

As folhas e galhos de *P. marginatum* foram coletados na Universidade Federal do Oeste do Pará (coordenadas 02°25'04.7 "Sul e 054°44'27.8 "Oeste), Campus Tapajós, no mês de abril de 2017.

A espécie utilizada nesse estudo foi identificada botanicamente e suas exsiccatas estão depositadas no Herbário da Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA), sob o número HSTM- n° 00370.

5.2 PREPARO E AQUISIÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *P. marginatum*

Para o preparo dos óleos essenciais utilizou-se 2.096 kg de folhas e 854 g de galhos coletados de *P. marginatum*. As folhas e galhos foram pesados em balança semianalítica, posteriormente colocados em estufa de circulação de ar a 35 °C; secos por um período de 10 dias e após secagem foram triturados separadamente, totalizando 284,16g de folhas e 128,26 g de galhos.

Os óleos essenciais de *P. marginatum* foram preparados no Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento de Produtos Bioativos (P&DBIO) do Instituto de Biodiversidade e Florestas da UFOPA.

Os óleos essenciais foram obtidos através do método de hidrodestilação utilizando o aparelho do tipo Clevenger. Foram utilizados 200 g da amostra de folhas e 100 g de galhos, colocadas cada amostra em um balão de fundo redondo contendo 3000 mL e 1500 mL, de água destilada, respectivamente. Os mesmos foram aquecidos em manta aquecedora até a ebulição da água, permanecendo por um tempo de destilação de 4h. Após obtenção dos óleos essenciais, foram calculados os rendimentos utilizando uma balança analítica e o material foi armazenado em frasco de vidro âmbar, devidamente identificado e acondicionado sob refrigeração.

5.3 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *P. marginatum*

A caracterização química foi realizada por Cromatografia gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (CG-EM) na Divisão de Química Orgânica e Farmacêutica do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da Universidade de Campinas – São Paulo (UNICAMP). A caracterização química foi realizada em um cromatógrafo a gás Agilent, modelo HP-6890 equipado com um detector seletivo de massas Agilent, modelo HP-5975 utilizando uma coluna capilar HP-5MS (30m x 0,25mm x 0,25µm) nas seguintes condições: temperatura do injetor = 250°C, coluna = 80°C, taxa de aquecimento de 5°C/min até 280°C (20 min) e detector = 300°C. Será utilizado hélio como gás de arraste numa vazão de 1mL/min e detector seletivo de massas operando a 70 eV, m/z =30 a 500 u.m.a. Os óleos essenciais de *P. marginatum* foram solubilizados e a identificação dos compostos majoritários realizada através da comparação entre os índices de retenção (IR)

calculados, com os disponíveis na literatura (Adams, 2005) e a base de dados da biblioteca NIST.

5.4 CULTIVO *IN VITRO* DAS FASES INTRARITROCITÁRIAS DE *P. falciparum*

Os parasitos da cepa (cloroquina-resistente) e cepa (cloroquina-sensível) foram cultivados em hemácias humanas *in vitro* sob condições estabelecidas por Trager e Jensen (1976), com adaptações (ANDRADE-NETO et al., 2004; CARVALHO et al., 1991) Os parasitos foram cultivados em placas de Petri com hematócrito a 5% usando meio de cultivo completo, isto é: RPMI 1640 suplementado com 25mM de HEPES, 21mM de bicarbonato de sódio, 300µM de hipoxantina, 11mM de glicose, 40µg/ml de gentamicina e 10% (v/v) de plasma humano inativado.

As placas foram mantidas à 37 °C em dessecadores nos quais a concentração adequada de O₂ foram obtidas pela combustão de uma vela, sendo realizadas trocas diárias de meio. A parasitemia foi monitorada diariamente em esfregaços, corados com Giemsa, ao microscópio óptico (1000x).

5.5 SINCRONIZAÇÃO DO CULTIVO DE *P. falciparum*

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

5.6 TESTES ESQUIZONTICIDAS *IN VITRO* COM *P. falciparum* UTILIZANDO O MICROTESTE TRADICIONAL

Para a avaliação dos óleos essenciais de *P. marginatum*, culturas sincronizadas com 2% de parasitemia no estágio de anel e 2% de hematócrito foram distribuídas em microplacas de 96 poços. Após aproximadamente uma hora de incubação nas condições descritas no item 5.4, tempo necessário para a sedimentação das hemácias, foi acrescentada a cada poço uma determinada quantidade de meio RPMI, contendo diferentes concentrações da amostra dos óleos essenciais testes em paralelo com antimaláricos de referência como a cloroquina,

em triplicatas. Após 24 e 48h de incubação dos parasitos a 37°C em dessecador, o meio de cultura com ou sem adição dos compostos foram trocado em cada poço. Esfregaços sanguíneos de todas as amostras foram confeccionados após 72 h, corados com Giemsa e examinados ao microscópio óptico para a determinação da parasitemia.

A média da parasitemia calculada nos poços sem adição de óleos essenciais (6 poços), considerada como 100% de crescimento do parasito, foram comparadas com as parasitemias nos poços que receberam os antimaláricos de referência e os compostos teste. A atividade dos óleos essenciais e do controle foi expressa como CI_{50} (concentração que inibe 50% do crescimento do parasito) (CARVALHO et al., 1991). Todos os experimentos foram realizados em triplicatas e a leitura através de lâminas codificadas.

5.7 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE

5.7.1 Cultivo de linhagens celulares

Para o cultivo foi utilizado a linhagem celular humana WI-26VA-4 (fibroblasto de pulmão ATCC CCL-95.1). Tal linhagem faz parte do banco de células animais do Serviço de Biologia Celular (SBC) da Fundação Ezequiel Dias (FUNED) / Belo Horizonte, no qual possui um laboratório com certificação ABNT NBR ISO 9001/2008 e se destaca no suporte ao desenvolvimento de projetos de pesquisa os quais requerem o acesso as técnicas de cultivo de células e tecidos, consolidando-se como referência em cultivo de células animais.

O conteúdo do criotubo (linhagem celular com 5% de DMSO e meio completo), mantido em nitrogênio líquido no banco de criopreservação (CryoPlus 7405/Thermo Scientific, EUA). Foi transferido para um tubo de centrifuga de 15 mL, contendo 2 mL de meio de cultura e então submetido a centrifugação durante cinco minutos. Posteriormente o sobrenadante foi descartado e a massa celular presente no fundo do tubo ressuspensa em 5 mL do meio de cultura 90 % de RPMI, 10 % Soro Fetal Bovino (SFB). A suspensão celular foi devidamente colocada em garrafa plástica de cultivo celular, tratada para promover a adesão celular, T75 (75 cm²)

(Corning Costar Inc., EUA) e mantida a 37° C em estufa com atmosfera úmida de 5 % de CO₂.

Para a manutenção da linhagem, após a adesão celular, o meio foi trocado a cada 48 horas para garantir a renovação dos nutrientes. Através do microscópio invertido em aumento de 40x (mod. Olympus, CKX 41) passível de se observar contaminações, morfologia celular e formação de monocamada. Quando a cultura apresentou formação de monocamada com 80 % de confluência, repicou-se a cultura utilizando a enzima tripsina (1:250 Sigma) para remover as células aderidas do fundo da garrafa. As células soltas foram ressuspensas em 5 mL de meio e recolhidas em tubo de centrifuga. O tubo foi centrifugado por 5 minutos a 2000 rpm e o sobrenadante descartado. A massa celular ressuspensa em 5 mL de meio novo e 50 µL da suspensão foi retirada para misturar com 50 µL de azul de tripan para contagem manual de células viáveis em câmara de Neubauer. O azul de tripan cora citoplasma de células mortas, possibilitando a contagem de células viáveis utilizando a câmara de Neubauer ao microscópio óptico 40X. Após contagem, as células foram distribuídas em placas de 96 poços para realização do ensaio de viabilidade celular.

5.7.2 Teste MTT (3-(4,5dimetiltiazol-2il)-2,5 difeniltetrazolico)

Para avaliar a citotoxicidade dos compostos fornecidos, utilizou-se do ensaio redução do MTT (3-(4,5dimetiltiazol-2il)-2,5 difeniltetrazólico). O MTT consiste em um sal tetrazólico que reage com as mitocôndrias de células viáveis formando um cristal de cor violeta, insolúvel em água, o formazan, que é solúvel em DMSO. Posteriormente a viabilidade celular foi calculada utilizando um leitor de placas de Elisa, em leitura da absorbância a 550 nm.

As células foram incubadas por 24 h em estufa a 37° C e atmosfera úmida de CO₂ a 5% e após esse período as células foram lavadas com solução salina tamponada (PBS). O teste de viabilidade celular consiste em transferir as células em uma placa de 96 poços na concentração de 1x10⁵ células/poço. Em seguida as moléculas foram diluídas em meio de cultivo fresco, contendo 1% de soro fetal bovino e adicionado a placa contendo diferentes concentrações dos compostos testados em triplicata. Após 48 h de incubação, foram adicionados 100 µl do sal tetrazolico MTT na concentração de 5mg/mL. As placas foram incubadas por 3 h e

após este tempo retirou-se o sobrenadante e aplicou-se 50 µl de DMSO em cada poço para solubilizar os cristais de formazan (MOSMANN, 1983).

A concentração letal mínima que inibe em 50 % o crescimento das células (CL₅₀) na presença dos compostos testes e do antimalárico controle cloroquina foram determinadas em comparação com células cultivadas sem a presença de compostos (considerada 100 % de crescimento) (MOREIRA et al., 2015).

Os valores de CL₅₀ foram calculados usando o programa OriginPro8.0 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA).

5.8 ÍNDICE DE SELETIVIDADE (IS)

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

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

5.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise dos dados e da correlação entre as diferentes variáveis estudadas, foi utilizado os softwares OriginPro versão 8.0 e Prism 5.0, respectivamente. Os dados apresentados em figuras e tabelas foram expressos em média ± desvio padrão (DP), com um nível de significância de $p \leq 0,05$.

5.10 DROGAS E SOLUÇÕES.

As drogas e soluções utilizadas neste estudo foram: óleos essenciais de folhas e galhos de *P. marginatum*, RPMI 1640, plasma humano inativado, Giemsa, sorbitol, PBS estéril (Tampão fosfato salino), soro fetal bovino, solução brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol (MTT) (Sigma), solução salina(Na cl 0,9%), reagente de Griess e nitrito sódico (Sigma), α-isonitrosopropilfenol , dimetilsulfóxido (DMSO, Fisher Chemical, EUA), azul de tripan, enzima tripsina, hepes, hipoxantina, água destilada, bicarbonato de sódio, gentamicina.

6 RESULTADOS

6.1 RENDIMENTO DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS E GALHOS

A partir da extração de 200 g de folhas de *P. marginatum* obteve-se 1,21 g de óleo essencial com rendimento de 0,60%. Para o óleo essencial de galhos o rendimento foi de 0,1% a partir de 100 g de galhos submetidas à hidrodestilação correspondendo a 0,10 g.

6.2 ATIVIDADE ANTIPLASMÓDICA

Os óleos essenciais de *P. marginatum* foram testados *in vitro* contra duas cepas de *P. falciparum*, no intuito de avaliar sua atividade antiplasmódica (Tabela 1).

Os resultados mostraram que os óleos essenciais de galhos e folhas foram ativos contra duas cepas de *P. falciparum*, com valores de CI_{50} igual a 5,34 $\mu\text{g/mL}$ e 4,94 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente, isto é, contra a cepa 3D7 denominada como cloroquina sensível (Tabela 1) e contra cepas W2, ou seja, cloroquina resistente, obtendo-se os valores de CI_{50} de 5,54 $\mu\text{g/mL}$ para o óleo de galhos e 5,14 $\mu\text{g/mL}$ para o óleo de folhas (Tabela 2).

Tabela 2: Resultados *in vitro* para a atividade antiplasmódica (CI_{50}) dos óleos de *P. marginatum* contra as cepas 3D7 de *P. falciparum*

Compostos	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) \pm DP 3D7	Atividade Antiplasmódica
OE dos galhos (1)	5,34 \pm 0,01	Ativo
OE das folhas (2)	4,94 \pm 0,04	Ativo
Cloroquina	0,19 \pm 0,02	Ativo

* DP: Desvio-Padrão

Tabela 2: comparação da atividade antiplasmódica dos óleos de *P. marginatum* com a droga de referência cloroquina, realizando testes esquizonticidas *in vitro* com microteste tradicional. A quantidade de parasitas foi medida por microscopia e os valores estão expressos em CI_{50} que corresponde a concentração inibitória capaz de matar 50% da população de parasitas.

Tabela 3: Resultados *in vitro* para a atividade antiplasmódica (CI₅₀) dos óleos de *P. marginatum* contra as cepas W2 de *P. falciparum*.

Compostos	CI ₅₀ (µg/mL) ± DP W2	Atividade Antiplasmódica
OE dos galhos (1)	5,54 ± 0,03	Ativo
OE das folhas (2)	5,14 ± 0,02	Ativo
Cloroquina	0,49 ± 0,05	Ativo

* DP: Desvio-Padrão

Tabela 3: Atividade antiplasmódica dos óleos de *P. marginatum* comparada com a droga de referência cloroquina, realizando testes esquizonticidas *in vitro* com microteste tradicional. A quantidade de parasitas foi medida por microscopia e os valores estão expressos em CI₅₀ que corresponde a concentração inibitória capaz de matar 50% da população de parasitas.

A atividade antiplasmódica dos óleos essenciais de galhos e folhas foi avaliada contra as cepas W2 e 3D7 em diferentes concentrações (3,12; 6,25; 12,5; 25; 50 µg/ml) como apresentado nas figuras 7 e 8. Após 72 horas de exposição contra as cepas de *P. falciparum* denominadas de cloroquina sensível (3D7), verificou-se uma redução da parasitemia de acordo com o aumento das concentrações dos óleos essenciais. Para o OE de galhos nas concentrações de 3,12 e 6,25 µg/ml teve uma redução em 40% da parasitemia, enquanto que para as concentrações de 12,5; 25 e 50 µg/ml os níveis de redução da parasitemia foram de 60%, 80% e 85% respectivamente. Nas mesmas concentrações do OE de folhas houve redução e variação de parasitemia de 45% na concentração de 3,12 µg/ml e 60% na concentração de 6,25 µg/ml, na concentração de 12,5 µg/ml observou-se uma variação para 40% na redução da parasitemia e nas concentrações de 25 e 50 µg/ml a parasitemia reduziu 65% e 90% respectivamente. Estes resultados apontam uma relação do potencial inibitório dos óleos essenciais com o aumento da concentração (Figura 7).

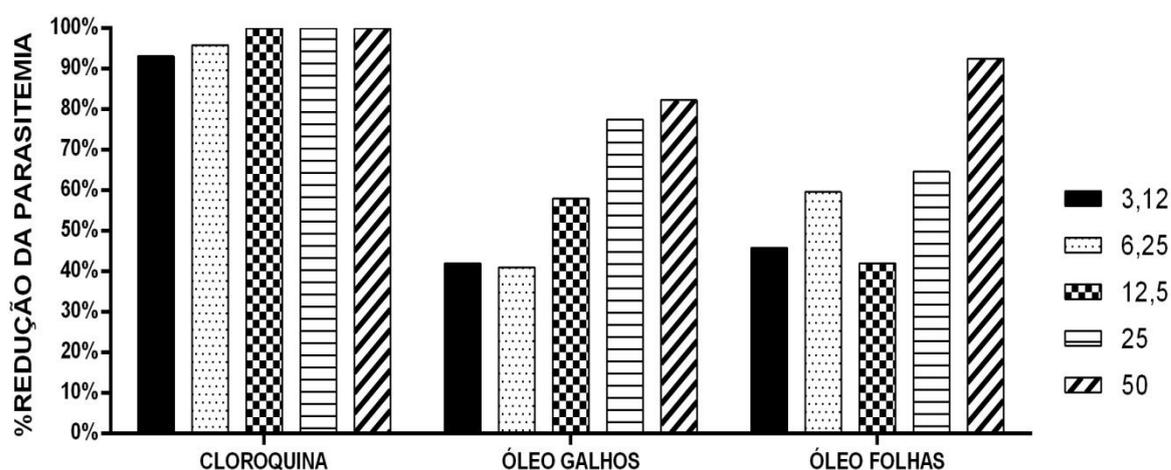


Figura 7- Avaliação da parasitemia de cepas de *P. falciparum* cloroquina sensível (3D7). Os parasitas foram expostos em diferentes concentrações (3,12; 6,25; 12,5; 25; 50 µg/ml) do óleo essencial de folhas e galhos da espécie *Piper marginatum* e cloroquina nas mesmas concentrações mantida por 72 horas a 37 °C em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de plasma humano inativado. A quantidade de parasitos foi determinada através microscopia óptica e expressa em porcentagem.

Na avaliação da atividade antimalárica em cepas de *P. falciparum* denominadas de cloroquina resistente (W2) mostrada na figura 8, também verificou-se uma redução da parasitemia de acordo com as concentrações dos óleos de galhos e folhas. Para o OE de galhos os níveis de parasitemia reduziram em cerca de 40%, 45% e 60% nas concentrações de 3,12; 6,25 e 12,5 µg/ml respectivamente. Na concentração de 25 µg/ml a redução da parasitemia foi de 90% e para concentração de 50 µg/ml a parasitemia reduziu em aproximadamente 98%.

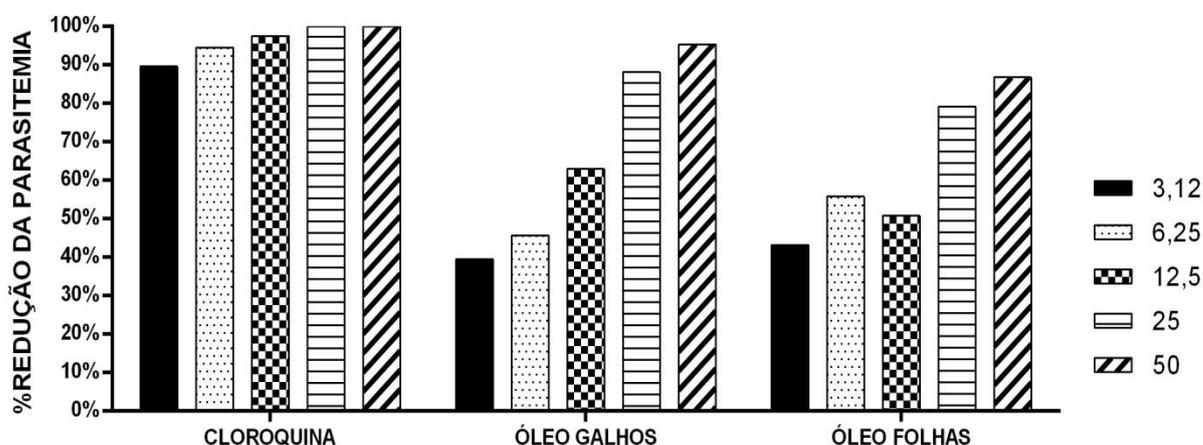


Figura 8- Avaliação da parasitemia de cepas de *P. falciparum* cloroquina resistente (W2). Os parasitas foram cultivados em diferentes concentrações (3,12; 6,25; 12,5; 25; 50 µg/ml) do óleo essencial de folhas e galhos da espécie *Piper marginatum* e cloroquina nas mesmas concentrações

mantida por 72 h a 37 °C em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de plasma humano inativado. A quantidade de parasitos foi determinada através microscopia óptica e expressa em porcentagem.

A figura 8 também mostra que para o óleo essencial de folhas se observou uma redução em torno de 45% e 58% da parasitemia nas concentrações de 3,12 e 6,25 µg/ml, e uma variação para cerca de 50% na redução da parasitemia na concentração de 12,5 µg/ml. Já nas concentrações de 25 e 50 µg/ml a parasitemia continuou reduzindo para cerca de 80% e 90% respectivamente.

6.3 VIABILIDADE CELULAR

A citotoxicidade dos óleos essenciais foi avaliada com uma linhagem de fibroblastos de células humanas (WI-26-VA4 # ATCC) usando método colorimétrico do MTT. Os resultados foram expressos como a média da CL_{50} (concentração letal para metade da população celular), para o qual apresentou valores maiores que 100 µg/ml para OEs de galhos e folhas. Assim observou-se que a concentração máxima utilizada neste estudo não apresenta efeito citotóxico para células viáveis, como apresentado na tabela 3.

Tabela 4: Ensaio *in vitro* de citotoxicidade dos óleos essenciais de folhas e galhos de *P. marginatum*.

Composto	LC50 (µg/ml)
	DP ±
Óleo dos galhos	>100
Óleo das folhas	>100
Cloroquina	>100

Tabela 4: A citotoxicidade dos óleos foi avaliada com uma linhagem de fibroblastos de células humanas (WI-26-VA4 # ATCC) usando método colorimétrico de MTT. A leitura foi realizada em leitor de microplacas Spectramax M5E a 550 nm.

6.4 ÍNDICE DE SELETIVIDADE (IS)

Na avaliação do Índice de Seletividade verificou-se que os óleos essenciais foram seletivos para as duas cepas de *P. falciparum*, sendo que o OE dos galhos apresentou IS de 18,73 para cepa sensível a cloroquina (3D7) e 18,05 para cepa resistente a cloroquina (W2). O óleo das folhas apresentou uma maior seletividade correspondendo a IS de 20,24 para cepa sensível a cloroquina e 19,46 para cepa resistente a cloroquina (Figura 4).

Tabela 5: Índice de seletividade dos óleos essenciais de folhas e galhos de *P. marginatum* para cepas de *P. falciparum*.

Composto	Índice de Seletividade	
	3D7	W2
Óleo galhos	>18,73	>18,05
Óleo folhas	>20,24	>19,46
Cloroquina	>526,32	>204,08

Tabela 5: O IS foi obtido através da razão entre o valor do CL_{50} e CI_{50} : $IS = CL_{50} WI_{26VA-4} / CI_{50} P. falciparum$.

6.4 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *P. marginatum*.

Os componentes químicos dos óleos essenciais de folhas e galhos foram identificados através da comparação dos seus espectros e índice de retenção calculados, com os padrões já definidos e armazenados em sistemas de dados de biblioteca de referência assim como aqueles citados na literatura (ADAMS, 2017; NIST-11).

O principal constituinte do óleo essencial de galhos foi sesquiterpeno óxido de cariofileno (30,29%), seguido dos sesquiterpenos espatulenol (7,74%), α -copaeno (6,49%), β -cariofileno (6,30%) e do fenilpropanoide safrol (4,20%) (tabela 5).

Tabela 6: composição química do óleo essencial de galhos de *P. marginatum* destacando como componentes majoritários (*) aqueles acima de 5%.

t_R (min)	IR	Identificação	% rel.
5,511	932	alfa Pineno	1,43
5,894	947	Canfeno	0,54
6,647	976	beta pineno	1,54
7,627	1009	3-careno	2,19
8,219	1026	limoneno	0,2
8,507	1034	(Z)-beta-ocimeno	0,17
8,866	1044	(E)-beta-ocimeno	0,14
10,748	1098	dehidrolinalol	1,67
12,498	1142	2-bornanona	1,04
12,981	1154	Isoborneol	0,3
13,345	1163	Borneol	0,18
14,018	1180	8-hidróxi- <i>p</i> -cimeno	0,19
14,698	1197	estragol	0,2
18,442	1286	safrol	4,2
19,422	1310	eucarvona	1,12
21,621	1362	gama muuroleno	0,25
22,089	1374	alfa copaeno	6,49*
22,768	1390	beta elemeno	0,8
23,326	1403	Metileugenol	3,23
23,859	1417	beta cariofileno	6,3*
24,248	1426	beta cedreno	0,27
25,222	1450	1,5,9,9-tetrametil-1,4,5-cicoundecatrieno	1,64
27,118	1498	alfa muuroleno	1,4
27,521	1508	miristicina	1,36
28,339	1529	3,4-metilenodioxipropiofenona	3,64
29,114	1549	elemol	2,54
29,392	1556	elemicina	1,13
30,132	1575	espatulenol	7,74*
30,338	1581	óxido de cariofileno	30,29*
31,282	1605	2-epóxido de humuleno	2,34
32,027	1625	muurola-4,10(14)-dien-1-b-ol	3,5
32,786	1646	beta eudesmol	2,93
32,951	1651	alfa cadinol	2,45
33,085	1654	gama-gurjuneno	2,46
33,566	1667	13-hidroxicaradieno	2,39
33,826	1674	mustacona	1,56

O principal componente do óleo essencial das folhas foi o fenilpropanoide 3,4-metilenodioxipropiofenona (12,43%), seguido de espatulenol (8,42%), 3-careno

(6,51%), dehidrolinalol (6,51%), óxido de cariofileno (6,39%), β -cariofileno (6,37%) e o safrol (4,73%) (tabela 4).

Tabela 7: Composição química do óleo essencial de folhas de *P. marginatum* destacando como componentes majoritários (*) aqueles acima de 5%

t_R (min)	IR	Identificação	% rel.
5,510	932	alfa pineno	1,13
6,647	976	beta pineno	0,87
7,646	1010	3-careno	6,51*
8,222	1026	limoneno	0,39
8,506	1034	(Z)-beta-ocimeno	0,73
8,866	1044	(E)-beta-ocimeno	0,83
10,798	1099	dehidrolinalol	6,51*
14,696	1197	estragol	0,17
18,477	1287	safrol	4,73
21,795	1366	n.i.	0,34
22,098	1374	alfa copaeno	2,68
22,452	1382	beta bourboneno	0,54
22,774	1390	beta elemeno	0,69
23,351	1404	metileugenol	2,32
23,895	1417	beta cariofileno	6,37*
24,829	1441	n.i.	0,39
25,232	1451	1,5,9,9-tetrametil-1,4,5-cicoundecatrieno	1,69
26,348	1479	beta copaeno	1,04
26,544	1483	beta selineno	1,24
26,974	1494	n.i.	2,71
27,128	1498	alfa muuroleno	0,64
27,296	1502	n.i.	0,71
27,550	1509	miristicina	3,43
27,728	1513	cubebol	0,54
27,895	1518	isocoweacina	0,54
28,033	1521	delta amorfeno	0,55
28,469	1532	3,4-metilenodioxipropiofenona	12,43*
29,047	1547	elemol	0,59
29,134	1550	n.i.	0,39
29,430	1557	elemicina	1,74
29,663	1563	nerolidol	1,18
30,188	1576	espatulenol*	8,42*
30,358	1580	óxido de cariofileno*	6,39*
31,293	1606	2-epóxido de humuleno	0,68
31,675	1616	n.i.	0,81
32,062	1626	muurola-4,10(14)-dien-1-b-ol	1,79
32,241	1631	8-epigama eldesmol	3,14

32,406	1636	n.i.	1,7
32,833	1647	beta eudesmol	3,86
32,941	1650	7-epi-alfaeudesmol	1,24
32,992	1652	alfa cadinol	1,32
33,133	1655	alfa-gurjuneno	2,96
33,544	1667	oxido-1-ledeno	0,99
48,103	2109	Fitol	1,98

n.i.= não identificados

7 DISCUSSÃO

Considerando o potencial farmacológico dos produtos naturais oriundos de metabólitos secundários das plantas, o presente estudo investigou a ação antiplasmódica *in vitro* dos óleos essenciais de *P. marginatum*.

A avaliação da atividade antiplasmódica *in vitro* mostrou que os óleos essenciais de *P. marginatum* foram ativos contra as cepas 3d7 denominada sensível a cloroquina, e cepas W2 denominada resistente a cloroquina. Sua atividade antiplasmódica foi evidenciada pelos resultados do teste da Concentração inibitória de 50% da população de *Plasmodium* (CI₅₀), onde para os óleos essenciais de galhos e folhas a CI₅₀ foram 5,34 e 4,94 µg/mL respectivamente, para a cepa 3d7. Para a cepa W2 a CI₅₀ do óleo de galhos foi de 5,54 µg/mL do óleo de folhas foi de 5,14 µg/mL. Comparando com os dados da literatura relatados para outras espécies do gênero *Piper* que já foram avaliadas em estudos *in vitro* para atividade antiplasmódica, como é o caso da *Piper holtonii* que apresentou CI₅₀ de 12,0 µg/mL (Maritza et al., 2014) e de *Piper sarmentosum* que apresentou CI₅₀ de 6,5 µg/mL para cepas de *P. falciparum* resistentes, de um de seus componentes isolado (RUKACHAISIRIKU et al., 2004), nossos resultados mostram que a espécie *P. marginatum* apresenta um significativo potencial antiplasmódico, com uma concentração inibitória menor que outras espécies do gênero *Piper* já descritas. Na busca de novos compostos eficazes contra a malária, é uma característica desejável em estudos *in vitro* a baixa concentração de CI₅₀, pois reduz o risco da ação não específica da droga e seu efeito citotóxico (RYCKMANS et al., 2009).

Também foram avaliados os níveis de parasitemia associados às diferentes concentrações dos óleos essenciais. Esta avaliação demonstrou que existe relação com a concentração dependente, ou seja, quanto maior a concentração do óleo essencial, maior é sua atividade antiplasmódica. Para cepas de *P. falciparum* resistentes a cloroquina, observamos uma redução significativa da parasitemia, alcançando 83 % em óleo de galhos e 93% em óleo de folhas em suas maiores concentrações. E para cepas resistentes a cloroquina os dados mostram uma redução de 98% para óleo de galhos e de 88% para óleo de folhas também em suas maiores concentrações. Este efeito foi próximo ao observado com a da cloroquina (100%), o antimalárico utilizado como padrão na terapia medicamentosa (BRASIL, 2010a, p. 299 - 308). Quanto a variação da parasitemia para o óleo dos galhos

(figuras 7 e 8), a mesma pode estar relacionada com o sinergismo entre constituintes presentes no óleo essencial.

A avaliação da citotoxicidade é um ensaio importante para a aprovação de uma droga com efeito antimalárico. Neste contexto, nossa pesquisa demonstrou que os óleos essenciais de *P. marginatum* apresentou uma baixa citotoxicidade com valores de CL_{50} maiores que 100 $\mu\text{g/ml}$, corroborando com a literatura, a qual mostra que óleo essencial de *P. marginatum* apresentou CL_{50} maior que 20 $\mu\text{g/ml}$ (OLIVERO-VERBEL *et al.* 2009). Estes dados também nos possibilitam constatar que os óleos essenciais da espécie *P. marginatum* são menos tóxicos que outras espécies do gênero *Piper* que apresentaram uma CL_{50} de até 2,54 $\mu\text{g/ml}$ (OLIVERO-VERBEL *ET AL.* 2009).

Além disso, nosso estudo também mostrou que os óleos essenciais de *P. marginatum* apresentaram um índice de seletividade entre 18,05 e 20,24, destacando-se o óleo essencial de galhos com maior seletividade, pois de acordo com a literatura os valores de IS devem ser maiores que 10 para indicar um potencial antimalárico (KATSUNO *et al.*, 2015). Assim, nossos resultados demonstraram que os óleos essenciais de *P. marginatum* apresentaram pouco efeito tóxico sobre as células viáveis e significativa seletividade para células parasitadas com o *P. falciparum*, bem como evidencia seu potencial antiplasmódico.

No que tange a identificação dos compostos químicos presente no óleo essencial de *P. marginatum*, nossos estudos identificaram que os componentes majoritários do óleo essencial de galhos foram o óxido de cariofileno (30,29%), seguido do espatulenol (7,74%), α -copaeno (6,49%), β -cariofileno (6,30%) e o safrol (4,20%). Já os componentes predominantes no óleo essencial de folhas foram o 3,4-metilenodioxipropiofenona (12,43%), seguido de espatulenol (8,42%), 3-careno (6,51%), dehidrolinalool (6,51%), óxido de cariofileno (6,39%), β -cariofileno (6,37%) e o safrol (4,73%). Ao comparar com a literatura também observamos que óxido de cariofileno está presente como produto natural oriundo de galhos e folhas de *P. marginatum* (Andrade *et al.* 2008; Autran *et al.* 2009; Oliveira Chaves & Oliveira Santos 2002), assim como a 3,4-metilenodioxipropiofenona (ANDRADE *et al.*, 2008; DIAZ & GOTTLIEB, 1979; RAMOS *et al.*, 1986; REIGADA *et al.* 2007).

Diante da predominância do sesquiterpeno óxido de cariofileno e do fenilpropanoide 3,4-metilenodioxipropiofenona nos óleos essenciais deste estudo,

inferimos que estas moléculas exerçam o potencial antiplasmodico nas hemácias parasitadas. Não encontramos na literatura estudos da espécie *P. marginatum* que avalie atividade antimalárica *in vivo* ou antiplasmodica *in vitro*, mas apenas a descrição de seu uso na medicina popular.

8. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, concluímos que os óleos essenciais de galhos e folhas de *P. marginatum* apresentaram atividade antiplasmódica significativa por reduzir o nível de parasitemia nas hemácias infectadas, baixo CI_{50} , alto índice de seletividade, e ainda, não apresentou citotoxicidade, viabilizando a continuação do estudo com a espécie, para posteriormente isolar seus bioativos e avaliar-los como potencial droga antimalárica assim como validar o seu uso na medicina popular como antimalárico originado de um produto natural.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, A. et al. Malária grave importada: relato de caso. Rev **Bras Ter Intensiva**;19(2):231-6. 2007.
- ARAÚJO, E. R. et al. Extratos de *Piper marginatum* e *Azadirachta indica* no controle de *Colletotrichum scovillei* em pimentão. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 49, n. 2, p. 88–94, fev. 2014.
- ARIAS, T., POSADA, R.C. & BORNSTEIN, A. New combinations. In *Manekia*, an earlier name for *Sarcorrhachis* (Piperaceae). *Novon* 16: 205-208. 2006
- ANDRADE-NETO V.F. et al. Antimalarial activity of *Bidens pilosa* L. (Aster-aceae) ethanol extracts from wild plants collected in various localities or plants cultivated in humus soil. **Phytother. Res.** 18, 634–639. 2004
- ANDRADE E.H.A. et. al. Variability in essential-oil composition of *Piper marginatum* sensu lato. **Chem. Biodivers.** 5, 197–208. 2008
- AUTRAN E. S. et al. Chemical composition, oviposition deterrent and larvicidal activities against *Aedes aegypti* of essential oils from *Piper marginatum* Jacq. (Piperaceae). **Bioresource Technology** 100 2284–2288. 2009
- BRAGA, R. Plantas do Nordeste, Especialmente do Ceará, fifth ed. Fundação Guimarães Duque/Fundação Vingt-Um Rosado, Mossoró. 2001
- BRASIL, Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde. **Boletim Epidemiológico**, Brasília. v. 44, n. 1, 2013.
- BRASIL. Ministério da Saúde do Brasil. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância **Epidemiológica. Situação Epidemiológica da Malária na Amazônia – Sivep Malária**. Brasília, 2011. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portalsaude/arquivos/pdf/2011/Set/05/jarbas_malaria_050911.pdf>. Acessada em Junho 2017.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 8. ed. rev. – Brasília: Ministério da Saúde, 2010.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia prático de tratamento da malária no Brasil** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2010.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Ações de controle da malária: manual para profissionais de saúde na atenção básica** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006.

BRÚ J. et al. Folk medicine, phytochemistry and pharmacological application of *Piper marginatum*. **Revista Brasileira de Farmacognosia** 26 767–779. 2016.

CAPANNA, E. Grassi versus Ross: who solved the riddle of malaria?. **International Microbiology**, 69-74. 2006

CARVALHO, L.H. et al. Anti- malarial activity of crude extracts from Brazilian plants studied in vivo in *Plasmodium berghei* infected mice and in vitro against *Plasmodium-falciparum* in culture. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 24, 1113–1123. 1991

D'ANGELO, L.C.A., Xavier, H.S., Torres, L.M., Lapa, A.J., Souccar, C. Pharmacology of *Piper marginatum* Jacq. a folk medicinal plant used as an analgesic, antiinflammatory and hemostatic. **Phytomedicine** 4, 33–40. 1997

DEHARO, E.; GINSBURG, H. Analyses of additivity and synergism in the anti-plasmodial effect of purified compounds from plant extracts. **Malaria Journal**. London, UK, v. 10. 2011.

Diaz, A.M., Gottlieb, O.R., 1979. Propiophenones from *Piper marginatum*. **PlantaMed.** 35, 190–191.

DING, X. C.; Raso, G.; Beck, H. P. *Plasmodium* sensitivity to artemisinin: magic bullets hit elusive targets. **Trends in Parasitology**, 73-75. 2011

DONDORP A. M. et al. Direct in vivo assessment of microcirculatory dysfunction in severe *falciparum* malaria. **J Infect Dis.**;197(1):79-84. 2008

FRASSON A. P. et al. Estratégias e desafios no combate à malária. **Revista Liberato**, Novo Hamburgo, v. 10, n. 14, p. 201-208, jul./dez. 2009

GOMES A. P.; Vitorino R. R.; Costa A. P.; Mendonça, E. G.; Oliveira, M. G. A.; Batista R. S. Malária grave por *Plasmodium falciparum*. **Rev Bras Ter Intensiva**; 23(3):358-369. 2011

GUERIN, P. J. et al. **Infect. Diseases.** 2002

GUIMARÃES, E. F.; CARVAHO-SILVA, M.; MONTEIRO, D.; MEDEIROS, E.S.; QUEIROZ, G. A. *Piperaceae* in Lista de espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/FichaPublicaTaxonUC/FichaPublicaTaxonUC.do?id=FB12813>>. Acesso em: 05 Mar. 2016

GREGSON, A.; Plowe, C. V.; **Pharmacological Rev**, 57, 117. 2005

GOMES, P. (). Immune Escape Strategies of Malaria Parasites. **Frontiers** 2016. Disponível em: <<http://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01617>>

HARRIS, F.; PHOENIX, D.A. An investigation into the ability of C-terminal homologues of *Escherichia coli* low molecular mass penicillin-binding proteins 4, 5 and 6 to undergo membrane interaction. **Biochimie**, v. 79, n. 4, p. 171-174, 1997.

HASTINGS, I. A.; DONNELLY, M. J.; **Drug Resistance Updates**. 2005.

HALDAR K.; MOHANDAS N. Malaria erythrocytic infection, and anemia. hematology am soc hematol educ program. 2009.

HVIID L. & LEA B. "Malaria vaccines: immunity, models and monoclonal antibodies." **Trends in parasitology** 24.9: 392-395. 2008.

HAHN, W. O., & POTTINGER, P. S. Malaria in the Traveler: How to Manage Before Departure and Evaluate Upon Return. *Medical Clinics of North America*, 100(2), 289–302. 2016. Disponível em: <<http://doi.org/10.1016/j.mcna.2015.09.008>>

JARAMILLO, M.A. & MANOS, P.S. Phylogeny and patterns of floral diversity in the genus *Piper* (Piperaceae). **American Journal of Botany** 88: 706-716. 2001.

KARUNAJEEWA, H. A., & MUELLER, I. How important is gametocyte clearance after malaria therapy **BMC Medicine**, 1–4. 2016. Disponível em:<<http://doi.org/10.1186/s12916-016-0641-3>>

Katsuno, k. et. al. Hit and lead criteria in drug discovery for infectious diseases of the developing world. *Nature Reviews Drug Discovery* · October 2015. Disponível em <<https://www.researchgate.net/publication/282590104>>

KEITANY, G. J., VIGNALI, M., & WANG, R. Live attenuated pre-erythrocytic malária vaccines. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*. 2014.

KRETTLI, A.U. Grande Endemias no Brasil. **Gazeta Médica da Bahia**, Salvador, BA, v. 78 (Suplemento 1): p. 74-78. 2008.

KOOGAN, R. L. et al. **Malária**. Rio de Janeiro: Guanabara. 2005.

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

KATO, M. J.; FURLAN, M. Chemistry and evolution of the Piperaceae. **Pure and Applied Chemistry**, v. 79, n. 4, p. 529–538, 1 jan. 2007

LAMBROS, C.; VANDERBERG, J.P. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. **J. Parasitol**, 65, 418–420.1979

LEITE, F. H. A. et al. Malária: Dos velhos fármacos aos novos alvos moleculares. **Biochemistry and Biotechnology Reports**., 60, 66-69. 2013

MARIATH, I. R. et al. Plants of the american continente with antimalarial activity. **Braz J. Pharmacology**, São Paulo, SP, v. 61, p. 1401-1433. 2009.

MARITZA, A.; CARDOZO, R.; CÁRDENAS, G. G.; VELANDIA, J. R. Actividad antiplasmódica *in vitro* de *Piper holtonii* (cordoncillo). *Revista Cubana de Plantas Medicinales* . 2014

MAXWELL, A., RAMPERSAD, D. PRENYLATED. 4-hydroxybenzoic acid derivatives from *Piper marginatum*. *J. Nat. Prod.* 51, 370–373. 1988

MEDEIROS, E.S. & Guimarães, E.F. Piperaceae do Parque Estadual do Ibitipoca, Minas Gerais, Brasil. *Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo* 25: 227-252. 2007

MILLER, L. H. et al.; *Nat. Med.* 19, 156. 2013

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

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65: 55-63, 1983.

MÜLLER, O. Malaria in Africa. Challenges for Control and Elimination in the 21 st Century, Peter Lang Publication, **Frankfurt am Main**, Germany. 2011

MUTIS M.C.S. et al. Malária. In: Coura JR. **Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; p. 833-58. 2005

NEVES, D. P. et al. **Parasitologia dinâmica**. 3 ed, são Paulo, Atheneu, 2009

OLIVEIRA SANTOS, B.V., OLIVEIRA CHAVES, M.C., 1999b. 2,4,5-Trimethoxypropiofenone from *Piper marginatum*. *Biochem. Syst. Ecol.* 27, 539–541

Olivero-Verbel, J., Gueette-Fernandez, J., Stashenko, E. Acute toxicity against *Artemia franciscana* of essential oils isolated from plants of the genus *Lippia* and *Piper* collected in Colombia. *Bol. Latinoam*, 2009. *Caribe* 8, 419–427

ORGANIZACAO MUNDIAL DA SAUDE. Relatório sobre o paludismo no mundo. 2015. Disponível em: <www.who.int>

OWENS, B. 2015 Nobel Prize goes to antiparasitic drug discoverers. **World Report**. 2015, 1433.

QUILEZ, A. BERENQUER, B GILARDONI. Anti-secretory, anti-inflammatory and anti-helicobacter pylori activities of several fractions isolated from *Piper carpubya*. 2010.

RAMOS, L.S., SILVA, M.L., Luz, A.I.R., ZOGHBI, M.G.B., MAIA, J.G.S., 1986. Essential oil of *Piper marginatum*. *J. Nat. Prod.* 49, 712–713.

REIGADA, J. B. et al. Chemical constituents from *Piper marginatum* Jacq. (Piperaceae)—antifungal activities and kinetic resolution of (RS)-marginatumol by *Candida antarctica* lipase (Novozym 435). **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 18, n. 9, p. 1054–1058, maio 2007.

RYCKMANS, T. et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, (19, 4406.)

ROBERT, A. et al. *Pure Appl. Chem.* **73**, 1173. 2001

RUKACHAISIRIKUL T, et al. Chemical constituents and bioactivity of *Piper sarmentosum*. *J Ethnopharmacol.* 2004;93(2-3):173-6.

SÁNCHEZ, Y. et al. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA Y ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ACEITE ESENCIAL OF *Piper marginatum* Jacq . **Revista de Proteccion Vegetal**, v. 26, n. 3, p. 170–176, 2011

SANTOS, P. R. D. DOS et al. Essential oil analysis of 10 Piperaceae species from the Brazilian Atlantic forest. **Phytochemistry**, v. 58, n. 4, p. 547–551, out. 2001.

SILVA, D. M. M. H.; BASTOS, C. N. Atividade antifúngica de Óleos Essenciais de Espécies de *Piper* Sobre *Crinipellis perniciososa* , *Phytophthora palmivora* e *Phytophthora capsici*. **Fitopatol. Bras.**, v. 32, n. 2, p. 143–145, 2007.

SILVA, T. H. et al. **Quim. Nova**, 28, 244. 2005.

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** 24 111–118. 2017.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática - Guia ilustrado para identificação de famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. Instituto Plantarum de Estudos da Flora, Nova Odessa, 2005.

TANOS, C. C. F. et al; Marta, G. S.; Villar J. D. F. MALÁRIA: ASPECTOS HISTÓRICOS E QUIMIOTERAPIA. **Quim. Nova**, Vol. 31, No. 5, 1271-1278, 2008.

TEBBS, M.C. Revision of *Piper* (Piperaceae) in the New World 1. Review of characters and taxonomy of *Piper* section *Macrostachys*. *Bulletin of the British Museum, Botany* 19: 117-158. 1989

TRAGER, W.; JENSEN, J.B. **Human malaria parasites in continuous culture..** *J. Parasitol*, 1976 91, 484–486.

VAN DER BERG, M.E. Plantas Medicinais na Amazônia- Contribuição ao Seu Conhecimento Sistemático, Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém. 1982

Yamamoto, D. S. et al. Inhibition of Malaria Infection in Transgenic Anopheline Mosquitoes Lacking Salivary Gland Cells. Disponível em:<
<http://doi.org/10.1371/journal.ppat.10>>

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Guidelines for the treatment of malaria. 2010. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241547925_eng.pdf>

WILLCOX, M. L.; BODEKER, G.; RASOANAIVO, P. (2004) Traditional Medicinal Plants and Malária. Tradicional Medicines for Modern Times. **CRC Press**, London, UK. 2004.

WHO, World Health Organization. World Malaria Report. 2010. Disponível em: http://who.int/malaria/world_malaria_report_2010/en/index.html, Acessada em Junho 2017.

ZAKARIA, Z A et al. in vivo anti-nociceptive of the aqueous extract of the leaves of *Piper samentosum*. 2010.