

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMALÁRICA *IN VITRO* DO CHÁ DE *ARTEMISIA ANNUA* CULTIVADA NA AMAZÔNIA

Ana Lúcia da Silva PEREIRA¹; Adrian Martin POHLIT²; Pedro Paulo Ribeiro VIEIRA³; Pedro Melillo de MAGALHÃES⁴; Luiz Francisco Rocha e SILVA⁵.

¹Bolsista PIBIC/CNPQ/INPA, ²Orientador INPA/CNPQ, ⁽³⁾ Co-orientador/FMTAM, ⁴Pesquisador UNICAMP, ⁵Bolsista FMTAM.

1. Introdução

Malária é uma doença infecciosa que acomete milhões de pessoas em áreas tropicais e subtropicais. Os parasitos da malária estão classificados, no filo Protozoa, classe Sporozoea, família Plasmodiidae, gênero *Plasmodium*, sendo que quatro espécies parasitam o homem: *P. vivax* (Grassi e Feletti, 1890), Labbé, 1899; *P. falciparum*, Welch, 1897), Shcaudinn, 1902; *P. malariae* (Laveran, 1881), Grasi e Feletti, 1890; e *P. ovale* Stephens, 1922 (Veronesi 2004). Atualmente há parasitas resistentes às drogas antimaláricas em todas as áreas endêmicas. Isto reforça a importância de se encontrar novas alternativas para o tratamento de pacientes portadores de cepas multiresistentes de *P. falciparum* (Cravo & Rosário, 2003). As plantas apresentam um papel fundamental na medicina popular, indicando alternativas para desenvolvimento de novas drogas no combate de diversas doenças (Andrade-Neto, *et al.*, 2007). A *A. annua* é uma planta de origem chinesa utilizada na forma de chá a mais de dois mil anos para o tratamento de febre e malária. A artemisinina foi considerada o principal componente antimalárico obtido das folhas de *A. annua* tendo sido isolada em 1972 (Ridder 2008). A artemisinina não é o único composto ativo presente em esta planta, existem outros metabólicos secundários responsáveis pela atividade antibacteriana, antiinflamatória e antimalárica (Bilia *et al.*, 2006).

O objetivo do trabalho foi avaliar a atividade antimalárica *in vitro* do chá (infusão) da *Artemisia annua* proveniente dos ecossistemas várzea, terra firme, e terra preta de índio, frente a cepas padrão e isolados de campo regionais de *P. falciparum*.

2. Material e métodos

A partir de folhas secas de *A. annua* coletada na várzea, terra firme, terra preta e provenientes de Campinas - SP foi preparada a infusão na proporção de 5 g de folhas secas por litro de água fervente, e deixado em repouso por 15 minutos. Em seguida o chá foi filtrado e testado quanto as suas propriedades inibitórias frente ao crescimento *in vitro* de *P. falciparum*. O chá foi testado em sete diluições com fator de 1:5 entre elas. A metodologia de cultivo *in vitro* de *P. falciparum* utilizada é uma modificação da técnica desenvolvida por (Trager e Jensen 1976) e baseia-se no desenvolvimento laboratorial dos estágios eritrocitários desta espécie parasitária. Após o processo de descongelamento das amostras, os parasitas foram mantidos a 37 °C em garrafas de poliestireno de 25 mL hermeticamente fechadas, é adicionadas a uma mistura de gases para manter uma micro-atmosfera de baixa tensão de oxigênio. Em cada garrafa de cultivo foi adicionada suspensão de eritrócitos suficiente para obtenção de 500 µL de sangue parasitado (suspensão de eritrócitos tipo A+ a 5 % (v/v) e um hematócrito de 50 %) e 4,5 mL de solução composta por meio RPMI 1640 (GIBCO). Foi realizada troca diária de meio RPMI suplementado com plasma humano inativado em banho-maria a 37 °C, sendo a retirada desse meio efetuada por aspiração com auxílio de uma pipeta de Pasteur esterilizada. Todo o procedimento de descongelamento e manutenção das culturas foi feito em ambiente de total assepsia (câmara de fluxo laminar). O acompanhamento do crescimento parasitário foi feito a cada 24h durante o procedimento de troca do meio de cultura e adição da mistura de gases. A contagem de parasitas viáveis foi feita pela observação de esfregaços hematológicos corados pelo método panótico®. A parasitemia foi calculada na forma de percentual das formas eritrocíticas viáveis observadas durante a contagem de 1000 hemácias. O microteste foi realizado segundo metodologia descrita por Rieckmann (1978), com modificações descritas por Andrade-Neto *et al.* (2007). Como controle foi utilizada a droga artemisinina. Os parasitos foram sincronizados no estágio de trofozoita jovem (forma anel) e aplicados em micro-placa com 96 poços, 180µL de suspensão de hemácias parasitaria em meio de cultura com hematócrito de 3% e parasitemia inicial de 1,5 % proveniente dos frascos de cultivo contínuo de *P. falciparum*. Em seguida foram adicionados 20 µL de solução da droga ou chá obtendo-se um volume final de 200 µL por poço. Cada concentração foi testada em triplicata. Poços contendo somente hemácias parasitadas suspensas em meio de cultura completo foram utilizadas como controle de crescimento. A placa foi incubada por 48 horas a 37 °C e baixa tensão de O₂ em câmara acrílica e estufa de cultura bacteriológica. Ao término do período de incubação da placa para análise microscópica foram realizados esfregaços sanguíneos com alíquota de hemácias retirada dos poços. Os esfregaços foram corados pelo método de panótico e

examinados no microscópio óptico com objetiva de 100x onde foi realizada a contagem de parasita presente num total de 2000 hemácias. A parasitemia foi expressa em porcentagem.

3. Resultados e discussão

Foi realizado micro-teste de sensibilidade *in vitro* com duas cepas padrão (K1 e 3D7) e dois isolados de campo (AM1 e AM2) frente aos antimaláricos tradicionais. As IC₅₀ das cepas e isolados de campo frente aos antimaláricos tradicionais estão expressas na Tabela 1. Todos os isolados de campo foram considerados resistentes a cloroquina ao apresentarem o IC₅₀ acima do limite de sensibilidade segundo a WHO (2006), e sensíveis à quinina e artemisinina.

Tabela 1. IC₅₀ das drogas cloroquina, quinina, artemisinina frente a cepas padrões e isolados de campos pelo método microscópio.

Cepa /isolados	Cloroquina	Quinina	Artemisinina
	ng/MI	ng/MI	ng/mL
K1	70,0	51,8	0,8
3D7	30,9	35,6	0,5
AM1	225,6	39,9	0,3
AM2	110,7	55,7	0,8

Foi recebido no laboratório de testes antimaláricos da FMTAM para o estudo *in vitro* com *P. falciparum*, um lote da primeira safra de *A. annua* proveniente dos ecos-sistemas amazônicos várzea (CHAAAVZ), terra firme (CHAAATF) e terra preta de índio (CHAAATP) e *A. annua* proveniente do CPQBA-UNICAMP (CHAAASP). A tabela 2 apresenta as IC₅₀ das infusões frente a cepas padrão e isolados de campo estabilizados sendo possível observar que os mesmos demonstraram alto grau de suscetibilidade ao chá da planta cultivada todos os ecos-sistemas.

Tabela 2. IC₅₀ da infusão da *A. annua* frente a cepas e isolados de campos pelo método microscópio.

CEPA/ISOLADOS	CHAAASP	CHAAATP	CHAAATF	CHAAAVZ
	μL/mL	μL/MI	μL/mL	μL/mL
K1	0,09	0,10	0,08	0,10
3D7	0,1	0,09	0,11	0,13
AM1	0,11	0,10	0,36	0,20
AM2	0,12	0,12	0,09	0,20

Não houve diferenças significativas entre as IC₅₀s geradas pelas amostras de *P. falciparum* estudadas frente as infusões das plantas de diferentes origens. As IC₅₀s variaram entre 0,08 e 0,13, com exceção do isolado de campo AM1 que apresentou menor susceptibilidade ao chá da planta cultivada na terra firme, produzindo uma IC₅₀ de 0,36 μL/mL.

4. Conclusão

Os resultados obtidos *in vitro* com as infusões da *A. annua* em adaptação nos ecos-sistema amazônicos frente às amostras de *P. falciparum* quando comparados com os resultados obtidos com a infusão da *A. annua* padronizada proveniente de São Paulo observa-se que não há diferença

significativa. Mesmo em altas diluições do chá ocorreu inibição do crescimento dos parasitas, pois os isolados de campos e as cepas padrão demonstraram alto grau de suscetibilidade às infusões.

5. Referências

- Alecrim, M.G.C. 1981. Estudo da resistência do *P. falciparum* as drogas antimalárica *in vitro* e *in vivo* na Amazônia. Brasília (DF): Universidade da Brasília.
- Andrade, Neto F.V.; Pohlit, M.A; Pinto, A.C.S; Silva, E.C; Nogueira, K.L; Melo, M.R.S; Henrique, M.C; Amorim, R.C.N; Silva, L.F.R; Costa, M.R.F; Nunomura, R.C; Nunomura, S.M; Alecrim, W.D; Alecrim, M.G.C.; Chaves, F.C.M.; Vieira, P.P.R. 2007 In vitro of *Plasmodium falciparum* by substances isolated from Amazonian antimalarial plants. Mem inst Oswaldo Cruz June; 102(3): 559-65.
- Bilia,A.R.; Melillo, M.P.; Bergonzi, M.C.; Vincieri, F.F. 2006. Simultaneous analysis of artemisinin and flavonoids of several extracts of *Artemisia annua* L. obtained from a commercial sample and selected cultivar. Phytomedicine. 13: 487-93.
- Cravo,P.; Rosário, V.D. 2003. Aspectos de genética molecular da resistência aos fármacos antimaláricos. Lisboa: Boletim de Biotecnologia.
- Ridder, S.; Kooy, F.V.D.; Verpoorte, R. 2008. *Artemisia annua* as a self-reliant treatment for malaria in developing countries. *Division of Pharmacognosy, Section of Metabolomics, Institute of Biology, Leiden Universit.*
- Rieckmann, K.H.; Vampbell, G.H.; Sax, L.J.; 1978. Drug Sensitivity of *P. falciparum* an "in vitro" microtechnique. The Lancet. 7: 22-23.
- Targer, W.; Jensen, J.B. 1976. Human malaria parasites in continuous culture. Science. 193: 673-75.
- Veronesi,R.; Focaccia, R. 2004. Tratado de infectologia. Sao Paulo 1591pp.
- WHO - World Health Organization. 2006. World Malaria Report [cited 2007 jun 26] Disponível em: URL: < http://www.rbm.who.int/wmr2005/pdf/adv_e.pdf>.