

## ATIVIDADE ANTIMALÁRICA *IN VITRO* DE OITO ESPÉCIES DE *Aspidosperma* SSP. FRENTE O *Plasmodium falciparum*

Joedh dos SANTOS<sup>1</sup>  
Wanderli Pedro TADEI<sup>2</sup>  
Luiz Francisco Rocha e SILVA<sup>3</sup>  
Márcia Rúbia de MELO<sup>3</sup>  
Sharleny Cruz MOURA<sup>1</sup>

Bolsista PIBIC/CNPq<sup>1</sup>; Orientador INPA<sup>2</sup>; Co-Orientador INPA<sup>3</sup>

### INTRODUÇÃO

A malária é a endemia parasitária mais prevalente no mundo, afetando cerca de 250 milhões de pessoas em mais de 109 países, especialmente no continente africano, Ásia e América Central. No Brasil, a doença é endêmica na região amazônica com transmissão esporádica em outras regiões devido à presença de vetores em mais de 80% do território nacional. Seu principal vetor no Brasil é o mosquito *Anopheles darlingi*. Embora, a tríade clássica da malária seja constituída por calafrios, febre intermitente e cefaleia, os sintomas da fase inicial - mal estar, náuseas, tonturas, cansaço, mialgia, febre contínua e sudorese - são inespecíficos e comuns à maioria das síndromes febris agudas, o que pode confundir profissionais de saúde e retardar o seu diagnóstico (Bressan *et al.* 2010). O *Plasmodium falciparum* tem apresentando diminuição da sensibilidade às drogas habitualmente usadas, constituindo sério problema para o controle e erradicação da malária. Atualmente todos os países com áreas malarígenas apresentam cepas resistentes de *P. falciparum* tanto à cloroquina como aos demais antimaláricos. (Gama *et al.* 2011). Estas evidências levam a refletir sobre a importância e a necessidade de se estudar plantas medicinais utilizadas tradicionalmente no tratamento da malária como fontes de novos antimaláricos. O gênero *Aspidosperma* Mart. Pertence à família Apocynaceae e é distribuído em regiões neotropicais. A característica marcante desse gênero é a presença de alcaloides indólicos, principalmente os monoterpênicos, reconhecidas às espécies desse gênero, tais como: antitumoral, antiplasmódica e antibacteriana consistente, em muitos casos com utilizações populares (Andrade-Neto *et al.* 2007; Henrique *et al.* 2010; *et al.* 2011). O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimalárica *in vitro* frente o *P. falciparum* de extratos obtidos de o espécies de *Aspidosperma* ssp. de ocorrência na região Amazônica.

### MATERIAL E MÉTODOS

Foram avaliados para atividade malárica *in vitro* 16 extratos e frações obtidos de oito espécies de *Aspidosperma* de ocorrência natural da região amazônica: *A. aracanga*, *A. desmanthum*, *A. marcgravianum*, *A. nitidum*, *A. sandwithianum*, *A. schultesii*, *A. spruceanum*, *A. vargasii*. Estas espécies foram trabalhadas pela doutora Marycleuma C. Henrique durante a dissertação de mestrado (Henrique 2007). O cultivo do *P. falciparum* dos testes de atividade antimalárica *in vitro* foram realizados no laboratório de Malária e Dengue (CPPS-INPA). No cultivo do parasita foram utilizadas a cepas K1 de *P. falciparum* com sangue A<sup>+</sup> mantidas em cultivo. Foi realizada troca diária e a adição de suspensão de hemácias não parasitadas em períodos de 48 horas, sempre que a cultura apresentasse predomínio de parasitas maduros a 2%.

Para avaliação da atividade antimalárica *in vitro* dos extratos foi realizado uma triagem onde as amostras foram testadas em duas concentrações, 50 e 5µg/mL. Para as amostras que se mostraram ativas no primeiro teste com uma inibição de acima de 80% na maior concentração, foi determinada a concentração que inibe 50% de crescimento (CI<sub>50</sub>) utilizando sete concentrações determinadas a partir do resultado da triagem inicial. O método por análise microscópica, o qual foi usado, realizou-se segundo a metodologia descrita por Rieckmann *et al.* (1978), com modificações descritas por Andrade-Neto *et al.* (2007). Soluções estoques foram inicialmente preparadas em dimetilsulfoxido (DMSO) na concentração de 5 mg/mL, e posteriormente diluídas em meio de cultura (RPMI-1640) de modo a obter sete concentrações finais para cada amostra. Cada diluição foi testada em duplicata em placa com hemácias parasitadas com hematócrito de 2% e parasitemia inicial de 1% sincronizada no estágio anel. O volume final de cada poço foi de 200 µg. Poços contendo somente hemácias parasitadas representaram o controle de crescimento. A placa foi incubada por 48 h a 37 °C e baixa tensão de O<sub>2</sub> nas mesmas condições de cultura. Após a incubação foram confeccionados esfregaços sanguíneos com o conteúdo de cada poço e corados pelo Panótico<sup>®</sup> sendo posteriormente examinados no microscópio óptico, onde se contou a quantidade de parasitos presentes num total de 2.000 hemácias. A parasitemia foi expressa em porcentagem. A concentração inibitória 50% (CI<sub>50</sub>) foi calculada com o auxílio do software Microcal Origin 8.1<sup>®</sup> (OriginLab).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os 16 extratos testados para atividade antimalárica foram obtidos das espécies de *Aspidosperma* de ocorrência natural da região amazônica: *A. aracanga*, *A. desmanthum*, *A. marcgravianum*, *A. nitidum*, *A. sandwithianum*, *A. schultesii*, *A. spruceanum*, *A. vargassii*. Houve a produção de extratos metanólicos e aquosos das cascas das plantas, com base no uso popular. Estes extratos e frações foram testados *in vitro* frente à cepa cloroquino-resistente K1 de *P. falciparum* ssp. (Andrade-Neto *et al.* 2004). Os resultados estão apresentados na tabela 1.

*A. marcgravianum*, *A. nitidum* e *A. vargassii* foram espécies que apresentaram maior atividade com  $CI_{50}$ s variando entre 0,20 e 4,38  $\mu\text{g/mL}$ , valor desejável para uma substância isolada, mas aqui se tratam de misturas complexas. A atividade antimalárica dos extratos era esperada uma vez que seus princípios ativos já foram isolados e testados *in vitro* pelo grupo de pesquisa frente ao *P. falciparum* em estudos anteriores (Andrade-Neto *et al.* 2007). Das cascas de *A. vargassii* e *A. desmanthum* foram isolados respectivamente os alcalóides indólicos elipticina ( $CI_{50} = 0,18 \mu\text{g/mL}$ ) e aspidocarpina ( $CI_{50} = 0,18 \mu\text{g/mL}$ ) com potente atividade frente à cepa K1 de *Plasmodium falciparum* (Andrade-Neto *et al.* 2007; Rocha-e-Silva *et al.* 2012).

É importante notar que as soluções aquosas de *A. desmanthum* são utilizadas pela população e apresentam-se inativas aqui, provavelmente por que o princípio ativo (elipticina) está muito diluído e pouco extraído por este método, visto que a substância é altamente apolar (Henrique *et al.* 2010).

Tabela 1. Atividade antimalárica *in vitro* de extratos das cascas de oito espécies de *Aspidosperma* da Amazônia frente à cepa K1 de *P. falciparum*.

Espécie vegetal	Solvente/Extratos	$CI_{50}$ [ $\mu\text{g/mL}$ ]	*Classificação da Atividade
<i>A. aracanga</i>	MeOH	16,7	PA
	H <sub>2</sub> O	> 50,0	I
<i>A. desmanthum</i>	MeOH	19,0	PA
	H <sub>2</sub> O	> 50,0	I
<i>A. marcgravianum</i>	MeOH	0,30	MA
	H <sub>2</sub> O	> 50,0	I
<i>A. nitidum</i>	MeOH	3,21	A
	H <sub>2</sub> O	0,20	MA
<i>A. sandwithianum</i>	MeOH	20,05	PA
	H <sub>2</sub> O	> 50,0	I
<i>A. schultesii</i>	MeOH	23,5	PA
	H <sub>2</sub> O	> 50,0	I
<i>A. spruceanum</i>	MeOH	10,6	PA
	H <sub>2</sub> O	> 50,0	I
<i>A. vargassii</i>	MeOH	4,38	A
	H <sub>2</sub> O	0,24	MA

\*Classificação da Atividade baseado na  $CI_{50}$ : MA = muito ativo (< 1,0  $\mu\text{g/mL}$ ),

A = ativo (entre 10 e 1,0  $\mu\text{g/mL}$ ), PA = parcialmente ativo (entre 10 e 50  $\mu\text{g/mL}$ ) e I = inativo (> 50  $\mu\text{g/mL}$ ).

## CONCLUSÃO

Os resultados juntamente com os dados da literatura discutida confirmam a atividade antiplasmodial *in vitro* de espécies de *Aspidosperma* usadas no tratamento da malária no Brasil. A importância da descoberta de futuras drogas a partir destes extratos pode auxiliar no controle da doença em regiões endêmicas como a Amazônia, visto que as plantas trabalhadas são naturais da região e estes achados encorajam a continuação de pesquisas fitoquímicas e farmacológicas destas espécies.

## REFERÊNCIAS

Andrade-Neto, V.F.; Goulart, M.O.; da Silva Filho, J.F.; da Silva, M.J.; Pinto, M.D.O.C.; Pinto, A.V.; Zalis, M.G.; Carvalho, L.H.; Krettli, A.U. 2004. Antimalarial activity of phenazines from lapachol, betalapachone and its derivatives against *Plasmodium falciparum* in vitro and *Plasmodium berghei* in vivo. *Bioorg Med Chem Lett*, 14(5): 1145-9.

- Andrade Neto, V.F.; Pohlit, A.M.; Pinto, A.C.; Silva, E.C.; Nogueira, K.L.; Melo, M.R. *et al.* 2007. In vitro inhibition of *Plasmodium falciparum* by substances isolated from Amazonian antimalarial plants. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 102(3): 359-65.
- Bressan, S.C; Pedro, S.R; Souza, V.R; Silva, S; Souza, R.P; Guaraldo, L; Cruz, F.F. M; Ribeiro, D.T. C; Brasil, P. 2010. Diagnóstico tardio de malária em área endêmica de dengue na extra-Amazônia Brasileira: experiência recente de uma unidade sentinela no estado do Rio de Janeiro. *Rev. Soc. Bras. Med. Tropical*, 43(5): 571-574.
- Gama, B.E.; Lacerda, M.V.G.; Daniel-Ribeiro, C.T.; Ferreira-da-Cruz, M.F. 2011. Chemoresistance of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* parasites in Brazil: consequences on disease morbidity and control. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 106(1): 159-166.
- Henrique, M.C. 2007. Estudo sobre a química e atividade biológica de *Aspidosperma desmanthum* e *Aspidosperma vargasii* (Apocynaceae). Departamento de Química. Manaus: Universidade Federal do Amazonas.
- Henrique, M.C.; Nunomura, S.M.; Pohlit, A.M. 2010. Alcalóides indólicos das cascas de *Aspidosperma vargasii* e *A. desmanthum*. *Química Nova*, 33: 2284-287.
- Rieckmann, K.H.; Campbell, G.H.; Sax, L.J.; Mrema, J.E. 1978. Drug sensitivity of *Plasmodium falciparum*. An in-vitro microtechnique. *Lancet*, 1(8054): 22-3.
- Rocha-e-Silva, L.F.; Magalhães, P.M.; Costa, M.R.; Alecrim, M.; Chaves, F.C.; Hidalgo, A.D.E.F.; Pohlit, A.M.; Vieira, P.P. 2012. In vitro susceptibility of *Plasmodium falciparum* Welch field isolates to infusions prepared from *Artemisia annua* cultivated in the Brazilian Amazon. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 107(7): 859-66.
- Trager, W.; Jensen, J.B. 1976. Human malaria parasites in continuous culture. *Science*, 193: 673-675.