

CULTIVO DE *Plasmodium falciparum* E TESTE DE ATIVIDADE ANTIMALÁRICA DE *Anacardium occidentale*, *Croton cajucara*, *Paullinia cupana* E *Quiina rhytidopus*

Sharleny Cruz MOURA¹
Adrian Martin POHLIT²
Rodrigo César das Neves AMORIM⁴
Luiz Francisco Rocha e SILVA³
Renata Braga Souza LIMA⁶
Wanderli Pedro TADEI⁵

¹Bolsista PIBIC/CNPq; ²Pesquisador INPA/CNPq/FAPEAM; ³Pesquisador FMT-AM/UFAM/CNPq; ⁴Co-orientador FMT-AM/UFAM/CNPq; ⁵Orientador INPA/CNPq; ⁶Doutorado INPA/UFAM/CNPq

INTRODUÇÃO

A malária chegou ao século XXI como um desafio de pesquisa não mais restrito aos países em desenvolvimento. A globalização e suas contrapartes saúde global e ciência globalizada são conceitos-chave para entender a crescente localização das doenças. Valores aproximados apontam que metade da população mundial está sob risco de malária: para uma estimativa de 207 milhões de casos no mundo em 2013 ocorreram 627 mil mortes no período, o que a coloca como um dos grandes problemas de saúde pública na perspectiva internacional (WHO 2013). Indicativo dessa centralidade foi sua inclusão nas Metas do Milênio: até 2015 a disseminação da malária deverá estar estabilizada, a partir de onde as epidemias deverão ser revertidas (UN 2010).

O fardo da malária no mundo é imenso. Os números falam por si: a morbidade anual da malária é de cerca de 500 milhões de pessoas, e uma estimativa conservadora de mortalidade de aproximadamente 2,7 milhões de vidas. No Brasil é quase exclusivamente (78,7% dos casos) restrita a região amazônica segundo o boletim epidemiológico, embora, o principal vetor está presente (*Anopheles darlingi*) esteja presente em cerca de 80% do país.

A espécie de *Plasmodium* mais amplamente disseminada em todo o mundo é o *P. vivax*. Esta espécie se encontra em quase todas as regiões onde a malária é endêmica. O *Plasmodium falciparum* causa a forma mais grave da doença, sendo o principal responsável pelas causas de óbito. O *Plasmodium falciparum* vem apresentando resistência aos antimaláricos existentes no mercado, por isso a importância de desenvolver novos antimaláricos (Fandeur *et al.* 1985;)

O tratamento profilático e curativo da malária ainda depende do uso de drogas clássicas como a cloroquina e seus derivados, tais como a pirimetamina e a quinina (Rang *et al.* 2001). Entretanto, o aparecimento de cepas de *P. falciparum* resistentes à cloroquina na década de 1960, principalmente na América do Sul e no sudeste asiático, tornou o desenvolvimento de novas drogas para o tratamento da malária uma emergência real (Fandeur *et al.* 1986).

Deve-se lembrar que as plantas são as fontes de compostos antimaláricos importantíssimos como a quinina (de *Cinchona* spp.) e artemisinina (da *Artemisia annua*). As plantas escolhidas para testes de atividade antimalárica são escolhidas a partir de sua região, onde se dá preferência das que estão no Brasil e pelo conhecimento cultural da população e destas plantas as que são utilizadas pela população para tratamento da malária, faz-se o estudo em cima destas plantas para verificar se existe atividade real antimalárica, assim dando estudo contínuo. Portanto as plantas utilizadas para o projeto foram:

Anacardium occidentale é uma planta rústica, originária do Brasil, sendo típica de regiões de clima tropical. Trata-se de uma árvore popular na América do Sul, sendo especialmente encontrada nas regiões Norte e Nordeste do Brasil (Assunção *et al.* 2000).

Croton cajucara é uma planta muito utilizada na Amazônia conhecida popularmente, como sacaca e utilizada sob forma de infuso ou decoto de sua casca e folhas. Vários autores relatam propriedades anti-inflamatória, hipoglicemiante, antiulcerogênicas, hipocolesterolêmicas e antiestrogênica (Carvalho 1992; Farias 1997; Brito *et al.* 1998).

Paullinia cupana ou o guaraná como é popularmente conhecida, é uma planta nativa da América do Sul e tem propriedades estimulantes, quando tomado por via oral. O guaraná também é usado para melhorar o desempenho atlético e para reduzir a fadiga. Tem sido usado no passado como afrodisíaco, diurético, adstringente, e para a prevenção da malária e disenteria, diarreia, febre, dor de cabeça e reumatismo (Pontieri *et al.* 2007).

Quiina rhytidopus faz parte de uma família pequena com 4 gêneros e 53 espécies, distribuídas nas regiões tropicais da América do Sul. O gênero *Quiina* apresenta folhas opostas com veias arqueadas em direção ao ápice (não paralelas), pouco proeminentes próximo à margem e dois pares de estípulas opostos na base das folhas terminais (Ribeiro *et al.* 1999). *Q. rhytidopus* é um arbusto que recebe o nome popular, característicos de plantas antimalárica: quinarana e

caferana, assim como outras espécies da Amazônia Brasileira: *Picrolemma sprucei* e *Tachia guyanensis* (Pio Corrêa 1926; Silva *et al.* 1977).

Assim o projeto prevê o estudo dos extratos de *Anacardium occidentale* *Croton cajucara*, *Paullinia cupana* e *Quiina rhytidopus*, obtidos pelo LAPAAM realizando testes antimálaricos *in vitro* contra a cepa K1 do *Plasmodium falciparum*, sabendo-se assim se existe ou não atividade antimalárica.

MATERIAL E METÓDOS

Cultivo *in vitro* de *P. falciparum*

Foi utilizada a cepa K1 de *P. falciparum* mantida em cultivo contínuo segundo método de (Trager e Jensen 1976). Baseia-se no desenvolvimento laboratorial dos estágios eritrocitários desta espécie parasitária. O bioensaio de atividade antimalárica foi originalmente desenvolvido por (Desjardins *et al.* 1979) e tem sido um dos testes mais utilizados para a avaliação do potencial de compostos antimaláricos.

Após a realização do descongelamento das amostras, os parasitas foram mantidos a 37°C em frascos de poliestireno de 25 mL hermeticamente fechados, e foi adicionada uma mistura de gases para manter uma micro-atmosfera de baixa tensão de oxigênio (5% de O₂, 5% de CO₂ e nitrogênio balanceado). Em cada frasco de cultivo foi adicionado suspensão de eritrócitos suficiente para a obtenção de 500 µL de sangue parasitado (suspensão de eritrócitos tipo A+ a 50% (v/v) em um hematócrito de 10%) e 4,5 mL de solução composta por meio RPMI 1640 suplementado a 10% de plasma humano tipo A+.

O acompanhamento do crescimento parasitário foi feito todos os dias, 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 estendidos hematológicos corados pelo método panótico (Trager e Jensen 1976).

A parasitemia foi calculada na forma de percentual de formas eritrocíticas viáveis observadas durante a contagem de 1000 hemácias. Após a estabilização dos isolados de *P. falciparum* em cultivo contínuo e estável, foi realizada a sincronização do desenvolvimento dos parasitos segundo Lambros e Vanderberg (1979).

Microteste por análise microscópica

O microteste por análise microscópica foi realizado segundo metodologia descrita por (Rieckmann 1978), com pequenas modificações descritas por (Andrade-Neto *et al.* 2007). Como controle foi utilizado as drogas Cloroquina e Quinina. Foram aplicados em micro-placa de 96 poços 180 µL de suspensão de hemácias parasitadas com predomínio de trofozoítos jovens (anéis) em meio de cultura com hematócrito de 3% e parasitemia de 1,5% provenientes dos frascos de cultivo contínuo de *Plasmodium spp.* Logo após foram adicionados 20 µL de solução com droga, extrato, ou substância, obtendo o volume final de 200 µL por poço. As amostras foram testadas em duas concentrações, 50 e 5 µg/mL e cada concentração foi testada em triplicata. Poços contendo somente hemácias parasitadas suspensas em meio de cultura completo foram o controle de crescimento. A placa foi incubada por 48 horas a 37°C e baixa tensão de O₂ em câmara acrílica e estufa bacteriológica. As parasitemias resultantes dos poços testes foram comparadas com as parasitemias dos poços controles para se avaliar o potencial de inibição de cada concentração.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 1. Teste de atividade antimalárica na cepa K1 de *Plasmodium falciparum* com diferentes extratos e partes das plantas de *Croton cajucar*, *Paullinia cupana*, *Quiina rhytidopus* e *Anacardium occidentale*.

Planta	Parte da Planta	Código	50 µg/mL	5 µg/mL	
<i>C. cajucara</i>	Casca	12RBS19D	89	50	A
	Folha	14RBS22B	17	0	I
<i>P. cupana</i>	Galho	7RBS10A	90	40	A
	Folha	3RBS46	1	0	I
	Fruto	12RBS19F	87,8	23,5	A
<i>Q. rhytidopus</i>	Folha	16RBS24B	50	18	PA
	Galho	5RBS8B	61	18	PA
<i>A. occidentale</i>	Casca	9RBS15C	100	16,5	A
	Folha	14RBS22C	94	0	A

80 a 100% = ativas (A)
50 a 79% = parcialmente ativas (PA)
< 50% = inativa (I)

Para a realização dos testes antes é realizado o cultivo do *P. falciparum in vitro* e durante todo o projeto manteve-se o cultivo. Fez-se extrato da casca de *C. cajucara* e *A. occidentale*, enquanto de *P. cupana* fez-se extrato do galho e fruto e *Q. rhytidopus* do galho em extrato clorofórmico o resultado baseia-se na concentração de 50 µg/mL.

Os extratos que se mostraram ATIVOS (A) foram: casca (12RBS19D) de *C. cajucara*, galho (7RBS10A) e fruto (12RBS19F) de *P. cupana*, casca (9RBS15C) e folha (14RBS22C) de *A. occidentale*. Os extratos que se mostraram PARCIALMENTE ATIVOS (PA) foram da folha (16RBS24B) e galho (5RBS8B) de *Q. rhytidopus* e os extratos que se mostraram INATIVOS (I) foram da folha (14RBS22B) de *C. cajucara* e folha (3RBS46) de *P. cupana*.

CONCLUSÃO

Os testes da atividade antimalárica foi um “Screening” para selecionar as amostras que foram ativas ou parcialmente ativas, para que se possa realizar novos testes, com as sete concentrações e definindo a CI_{50} dos extratos (Concentração inibitória de 50%). Após o cálculo da CI_{50} , as amostras que forem mais ativas serão submetidas a novos processos de prospecção fitoquímica.

REFERÊNCIAS

- 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.
- Assunção, R.B.; Mercadante, A.Z. 2000. Caju in natura (*Anacardium occidentale* L.) – carotenóides e vitamina C. In: XVII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2000, Fortaleza, Ceará. Resumos.... Fortaleza: SBCTA, 2(5): 101.
- Brito, A.; Rodriguez, J.A.; Hiruma-Lima, C.A.; Haum, M.; Nunes, D.S. 1998. Antiulcerogenic from the bark of *Croton cajucara*, Benth on experimental gastric ulcer models in rats and mice. *J Pharm Pharmacol*, 51(12): 341-6.
- Carvalho, J.C.T. 1992. Investigation of anti-inflammatory and antinociceptive activities of trans – dehydrocotonin, a 19 – nor – clerodane diterpene from *Croton cajucara*. *Planta Medica*, 62(5): 402-4.
- Desjardins, R.E.; Canfield, C.J.; Haynes, J.D.; Chulay, J.D. 1979. Antimicrob Agents, *Chemoter*, 16: 710.
- Fandeur, T.; Moretti, C.; Polonsky, J. 1985. *In vitro* and *in vivo* assesment of the antimalarial activity of Sergeolide. *Planta Medica*, 51: 20-23.
- Farias R.A.F. 1997. Hypoglycemic effect of trnas-dehydrocrotonin, a nor-clerodane diterpene from *Croton cajucara*. *Planta Medica*, 63(2):558-61.
- Lambros, C.; Vanderberg, J.P. 1979. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *J Parasitol*, 65: 418-420.
- O’Neil, M.J.; Bray, D.H.; Boardman, P.; Wright, C.W.; Phillipson, J.D.; Warhust, D.C.; Gupta, M.P.; Correya, M.; Solis, P. 1986. Plants as sources of antimalarial drugs: *in vitro* antimalarial activities of some quassinoids. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 30: 101-104.
- Pio Corrêa, M. 1926. *Dicionário de plantas Úteis do Brasil*. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional.
- Pontieri V.; Neto A.S.; de França Carmargo, A.F.; Koike, M.K.; Velasco, I.T. 2007. The Herbal drug *Catuama* reverts and prevents ventricular fibrillation in the isolated rabbit heart. *J Eletrocardiol*, 40(6): 534-8.
- Rang, H.P.; Dale, M.M.; Ritter, J.M. 2001. *Farmacologia*. v.4. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 610-618.
- 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.
- Trager, W.; Jensen, J.B. 1976. Human malaria parasites in continuous culture. *Science*, 193: 673-675.
- UNITED NATIONS. 2010. The Millennium development goals report. New York: ONU. (http://www.un.org/millenniumgoals/pdf/MDG%20Report%202010%20En_20r15%20-low%20res%2020100615%20.pdf) Acesso em 20/08/2013.
- Van Agtmael, M.; Eggelte, T.A.; Van Boxtel, C.J. 1999. Artemisinin drugs in the treatment of malaria: from medicinal herb to registered medication. *Trends in Pharmacological Science*, 20: 199-205.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. 2013. World malaria report 2013. Geneva:WHO. (http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241563901_eng.PDF). Acesso em 29/05/ 2014.