



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE**  
**CENTRO DE BIOCÊNCIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**GRACIELLE RODRIGUES DANTAS**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMALÁRICA DE EXTRATOS OBTIDOS DE  
ALGAS MARINHAS NO LITORAL DO RIO GRANDE DO NORTE**

**NATAL**  
**2012**

GRACIELLE RODRIGUES DANTAS

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMALÁRICA DE EXTRATOS OBTIDOS DE  
ALGAS MARINHAS NO LITORAL DO RIO GRANDE DO NORTE

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Rio Grande do Norte como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Valter Ferreira de Andrade Neto

NATAL

2012

Catálogo da Publicação na Fonte. UFRN / Biblioteca Setorial do Centro de  
Biotecnologia

Dantas, Gracielle Rodrigues

Avaliação da atividade antimalárica de extratos obtidos de algas  
marinhas no litoral do Rio Grande do Norte / Gracielle Rodrigues Dantas.  
- Natal, 2012.

71 f.: Il.

Orientador: Prof. Dr. Valter Ferreira de Andrade Neto.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do  
Norte, Centro de Biotecnologia. Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Biológicas.

I. Malária – Dissertação 2. Algas marinhas – Dissertação. 3. Extratos  
brutos – Dissertação. I. Andrade Neto, Valter Ferreira de. II.  
Universidade Federal do Rio Grande do Norte. III. Título.

RN/UF/BSE-CB

CDU 616.936

GRACIELLE RODRIGUES DANTAS

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMALÁRICA DE EXTRATOS OBTIDOS DE  
ALGAS MARINHAS NO LITORAL DO RIO GRANDE DO NORTE

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Rio Grande do Norte como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Aprovada em \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_.

---

Prof. Dr. Valter Ferreira de Andrade Neto  
Presidente - Departamento de Microbiologia e Parasitologia

---

Prof. Dr. Daniel de Lima Pontes  
Instituto de Química - UFRN

---

Profª. Dra. Maria de Fátima Nogueira  
IHMT – Lisboa / Portugal

## AGRADECIMENTOS

Seria impossível ter chegado aqui sem a ajuda e colaboração de inúmeras pessoas que me acompanharam direta e indiretamente, por alguns instantes ou de forma contínua, de perto ou de longe. Para que eu não cometa nenhuma injustiça, agradeço a todos que colaboraram direta e indiretamente com a realização do mesmo. Mas, em especial, ressalvo algumas pessoas.

Professor Dr. Valter Ferreira de Andrade Neto, que desde o início acreditou na ideia do trabalho pioneiro, comprometeu-se com todas as etapas do mestrado e do trabalho aqui realizado, fornecendo todas as condições físicas, materiais, científicas e demais necessárias para a realização do trabalho; pelas extensas horas de conversas e discussão de trabalhos; pelas leituras de lâminas, acompanhamento de experimentos; por toda dedicação, paciência e profissionalismo aqui empregados;

Professor Dr. Hugo Oliveira Rocha, sendo mais que um co-orientador; um pai científico, a quem sempre recorria nos momentos de mais aperto (risos), pela colaboração com as coletas de algas, discussão de trabalhos na área fitoquímica, almoços pós-coleta, momentos de diversão, momentos de seriedade; contribuição ímpar na realização desse trabalho;

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, que contribuíram imensamente para a minha formação acadêmica;

Aos professores Dr. Rodrigo Amorim, Dra. Marcia Rúbia e Dr. Luiz Rocha, que gentilmente me receberam durante as realizações dos testes em Manaus-AM, sendo os integrantes iniciais nessa caminhada de pesquisa, principalmente na abordagem fitoquímica;

Ao Sr. Williams (química – vidrarias), Sr. Edson Santana, Rízia e Eva – técnicos em Parasitologia, pelo apoio técnico fornecido;

Louise e Liege, secretarias do PPgCB, sempre atenciosas em minhas solicitações e dúvidas;

Laboratórios – BIOPOL, LAMA, LAMAQ, LBMG, pela colaboração na realização das extrações, dos testes e experimentos;

A todos os integrantes do LABMAT, em especial: Claudio Bruno e Ywlliane Meurer, que contribuíram substancialmente para meus experimentos; a todos os que me doaram seu próprio sangue – literalmente – para manutenção da cultura celular;

Aos alunos de iniciação científica: Ganilson, Valber, Juliete, que me auxiliaram desde o início – ou no final dos experimentos;

Aos alunos dos demais laboratórios: Abinadabe (LBMG), José Paulo (LAMAQ), Nilmara e Mayara (LAMA), ao amigo Jethe Nunes (Imunogenética) pelo auxílio nos experimentos (nos dias e horas mais inusitadas possíveis)

Às antigas integrantes do LABMAT: Alline Mylena, por todo seu conhecimento compartilhado comigo; Milena Clementino, pelo apoio, palavras e colaboração científica.

Ao meu namorado, Henrique, pela paciência, compreensão, doações de sangue, noites abdicadas da minha presença, brigas devido a minha ausência, mas principalmente pelo apoio, carinho a ajuda sem medidas, à sua maneira, para que esse trabalho fosse realizado.

A toda a minha família, em especial Tânia Maria Rodrigues Dantas e Reginaldo Andrade Dantas, meus pais; imprescindíveis para que eu chegasse até aqui; pelo apoio, dedicação, auxílio, carinho, compreensão;

Aos amigos ausentes e presentes, em especial Alice de Castro Canela e Renata Kaline de Sousa Estevam, que me incentivaram e ajudaram para que o trabalho fosse cumprido;

A todos que esqueci de citar aqui, mas toda a minha gratidão é dada.

Mas nada disso seria possível sem a presença de alguém mais que importante; à ELE, meu eterno agradecimento especial: DEUS. Obrigada por segurar minha mão nos momentos de queda, por me levantar, por me fazer caminhar e permitir ter chegado até aqui. Graças e louvores sejam dados sempre!

Gracielle Rodrigues Dantas

“Quando nada parece dar certo, vou ver o cortador de pedras martelando sua rocha talvez 100 vezes, sem que uma única rachadura apareça. Mas na centésima primeira martelada a pedra se abre em duas, e eu sei que não foi aquela que conseguiu isso, mas todas as que vieram antes”.

*J. Riis*

## RESUMO

A malária é a maior doença parasítica mundial, responsável por cerca de 500 milhões de casos e causando 2 a 3 milhões de mortes anualmente. Quatro espécies são responsáveis pela transmissão dessa doença ao homem: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* e *Plasmodium ovale*. A resistência do parasito aos antimaláricos usuais e as limitações existentes no combate ao vetor são implicações que contribuem para a expansão dessa parasitose. Os avanços mais significativos na busca de novos medicamentos contra a malária baseiam-se em componentes naturais, sendo os principais antimaláricos atualmente utilizados derivados de plantas. Pesquisas com produtos naturais de origem marinha (particularmente as algas) mostram que algumas espécies possuem atividade antiplasmódica. Sabendo que o litoral do Rio Grande do Norte abriga várias espécies de algas, o presente estudo consistiu em avaliar, pela primeira vez, a atividade antimalárica dos extratos etanólicos das algas *Spatoglossum schroederi*, *Gracilaria birdiae* e *Udotea flabellum* contra a cepa 3D7 *Plasmodium falciparum* em testes *in vitro* e utilizando o modelo murino (*P. berghei*) para avaliação *in vivo*. As algas foram trituradas, maceradas com etanol por 24 horas e os extratos concentrados em rotaevaporador (45° C ± 5°C). Para os testes *in vitro*, os extratos foram diluídos e testados nas concentrações entre 100 e 1,56 µg/ml (sete concentrações em triplicata), com a finalidade de obtenção da CI<sub>50</sub> de cada extrato. Os testes de citotoxicidade com macrófagos e células BGM foram realizados usando o ensaio colorimétrico MTT. Macrófagos e células BGM foram distribuídas em 96 poços por placa (1x 10<sup>5</sup> para macrófagos e 1x10<sup>4</sup> células por poço para BGM), sendo incubadas por 24h a 37°C. Os extratos etanólicos foram diluídos e testados nas concentrações de 100 até 1,56 µg/ml (sete concentrações em triplicata). Após períodos de 24h de incubação com os extratos, 100 µl de MTT foi adicionado a cada poço, e decorridas 3h, o sobrenadante foi removido e adicionou-se 200 µl DMSO em cada poço. A absorbância de cada poço foi obtida através de leitura em espectrofotômetro com filtro de 570 nm. Para avaliar a toxicidade aguda *in vivo*, camundongos *Swiss* receberam dose única (oral) de 2000 mg/kg/animal dos extratos testados. Os parâmetros de toxicidade aguda foram observados durante 8 dias. Para os testes *in vivo*, camundongos *Swiss* foram inoculados com 1x10<sup>5</sup> hemácias infectadas com *Plasmodium berghei*. O tratamento deu-se do primeiro ao quarto dia após a infecção, com 0,2 ml dos extratos em doses de 1000 e 500 mg/kg/animal. O grupo controle negativo recebeu 0,2 ml de Tween-20 2%, enquanto que o grupo controle positivo recebeu sub-dose de cloroquina (5 mg/kg/animal). A avaliação da atividade antimalárica foi feita através da supressão da parasitemia no 5º e 7º dias após infecção. A inibição do crescimento dos parasitos foi determinada em relação ao grupo controle negativo (% inibição = parasitemia do controle – parasitemia com amostra/ parasitemia do controle x 100); a mortalidade dos animais foi acompanhada diariamente por 30 dias. Os resultados mostraram que as algas *Spatoglossum schroederi* e *Udotea flabellum* apresentaram atividade antimalárica *in vitro*, com redução da parasitemia de 70,54 e 54%, respectivamente. Os extratos das três algas testadas mostraram citotoxicidade moderada a elevada. As algas *S. schroederi* e *U. flabellum* foram ativas contra o *P. berghei* apenas nas doses de 500 mg/kg com redução variando de 54,58 a 52,65% para o quinto dia e 32,24 a 47,34% para o sétimo dia, respectivamente. Não foi observada toxicidade *in vivo* para a dose testada, durante os 8 dias de observação. Embora sejam dados preliminares, os possíveis componentes bioativos presentes nessas algas marinhas podem ser promissores para o desenvolvimento de novas drogas antimaláricas.

**Palavras-chave:** Malária. Algas marinhas. Extratos brutos. Atividade antiplasmódica.



## ABSTRACT

Malaria is a major parasitic disease worldwide, accounting for about 500 million cases and causing 2 million to 3 million deaths annually. Four species are responsible for transmitting this disease to humans: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* and *Plasmodium ovale*. The parasite resistance to antimalarial drugs and the usual limitations of the vector control implications are contributing to the spread of the disease. The most of significant advances in the search for new antimalarial drugs is based on natural components, the main ones being currently used antimalarial drugs derived from plants. Research on natural products of marine origin (particularly algae) show that some species possess antiplasmodial activity. Knowing that the coast of Rio Grande do Norte is home to several species of algae, the present study was to evaluate, for the first time, the antimalarial activity of ethanolic extracts of seaweed *Spatoglossum schroederi*, *Gracilaria birdiae* and *Udotea flabellum* against *Plasmodium falciparum* 3D7 strain tests and *in vitro* using the murine model (*Plasmodium berghei*) for evaluation *in vivo*. These species were ground, macerated with ethanol for 24 hours and the extracts concentrated in rotaevaporador ( $45^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ ). For *in vitro* tests, the extracts were diluted and tested at concentrations between 100 and 1.56  $\mu\text{g/ml}$  (seven concentrations in triplicate), in order to obtain  $\text{IC}_{50}$  of each extract. The cytotoxicity tests with macrophages and BGM were performed using the MTT colorimetric assay. BGM macrophages and cells were distributed in 96 wells per plate ( $1 \times 10^5$  to macrophages and  $1 \times 10^4$  cells per well for BGM) and incubated for 24h at  $37^{\circ}\text{C}$ . The ethanol extracts were diluted and tested at concentrations of 100 to 1,56  $\mu\text{g/ml}$  (seven concentrations in triplicate). After periods of 24 hours of incubation with the extracts, 100  $\mu\text{g}$  of MTT was added to each well, and 3 hours elapsed, the supernatant was removed and added 200  $\mu\text{l}$  of DMSO in each well. The absorbance of each well was obtained by reading on a spectrophotometer at 570 nm filter. To evaluate the acute toxicity *in vivo*, Swiss mice received a single dose (oral) 2000 mg/kg/animal of each extract tested. The parameters of acute toxicity were observed for 8 days. For *in vivo* tests, Swiss mice were inoculated with  $1 \times 10^5$  erythrocytes infected with *P. berghei*. The treatment was given first to fourth day after infection with 0.2 ml of the extracts in doses of 1000 and 500 mg//g animal. The negative control group received 0.2 ml of 2% Tween-20, whereas the positive control group received sub-dose of chloroquine (5 mg/kg/animal). The assessment of antimalarial activity was done by suppressing suppressing the parasitemia at 5 and 7 days after infection. The growth inhibition of parasites was determined relative to negative control (% inhibition =  $\frac{\text{parasitemia in control} - \text{parasitemia in sample}}{\text{parasitemia control}} \times 100$ ), the mortality of animals was monitored daily for 30 days. The results showed that algae *Spatoglossum schroederi* and *Udotea flabellum* showed antimalarial activity *in vitro*, with reduced parasitemia of 70.54% and 54, respectively. The extracts of the three algae tested showed moderate to high cytotoxicity. Algae *S. schroederi* and *U. flabellum* were active against *P. berghei* only at doses of 500 mg / kg with reduction ranging from 54.58 to 52.65% for the fifth day and from 32.24 to 47.34% for the seventh day, respectively. No toxicity was observed *in vivo* at the dose tested, over the 8 days of observation. Although preliminary data, the bioactive components in those possible seaweed may be promising for the development of new anti-malarial drugs.

**Key-words: Malaria. Seaweeds. Crude extracts. Antiplasmodial activity.**

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa endêmico da transmissão de malária no mundo em 2009.	15
Figura 2. Registro de casos de malária e espécies parasitárias ( <i>P. falciparum</i> e <i>P. vivax</i> ). Brasil, 1960 a 2008.	16
Figura 3. Ciclo biológico do <i>Plasmodium</i> no hospedeiro definitivo e intermediário.	23
Figura 4. Estrutura química da artemisinina	25
Figura 5. Representação gráfica da porcentagem de falha terapêutica no tratamento para malária no mundo (2000-2010).	28
Figura 6. Alga vermelha <i>Gracilaria birdiae</i> .	31
Figura 7. Alga marrom <i>Spatoglossum schroederi</i> .	32
Figura 8. Alga verde <i>Udotea flabellum</i> .	32
Figura 9. Estrutura da quinina, um alcaloide presente nas plantas <i>Cinchona calisaya</i> e <i>C. succirubra</i> , e de antimaláricos sintetizados a partir do seu anel quinolínico.	33
Figura 10. Local de coleta da alga vermelha <i>Gracilaria birdiae</i> . Praia do Rio do fogo, RN.	36
Figura 11. Local de coleta das algas <i>Udotea flabellum</i> e <i>Spatoglossum schroederi</i> . Praia de Búzios, RN.	36
Figura 12: Processo de obtenção do pó fino das algas após trituração com nitrogênio líquido.	37
Figura 13. Evaporador rotativo utilizado para obtenção de extratos brutos.	37
Figura 14. Gráfico de viabilidade celular (média $\pm$ desvio padrão do percentual de crescimento celular) de macrófagos com o extrato de <i>Gracilaria birdiae</i> .	45
Figura 15. Gráfico de viabilidade celular (média $\pm$ desvio padrão do percentual de crescimento celular) de macrófagos com o extrato de <i>Spatoglossum schroederi</i> .	45
Figura 16. Gráfico de viabilidade celular (média $\pm$ desvio padrão do percentual de crescimento celular) de macrófagos com o extrato de <i>Udotea flabellum</i> .	46
Figura 17. Gráfico de viabilidade celular (média $\pm$ desvio padrão do percentual de crescimento celular) de células BGM com o extrato de <i>Gracilaria birdiae</i> .	46
Figura 18. Gráfico de viabilidade celular (média $\pm$ desvio padrão do percentual de	47

- crescimento celular) de células BGM com o extrato de *Spatoglossum schroederi*.
- Figura 19. Gráfico de viabilidade celular (média  $\pm$  desvio padrão do percentual de crescimento celular) de células BGM com o extrato de *Udotea flabellum*. 47
- Figura 20. Gráfico de redução de parasitemia (média  $\pm$  desvio padrão) do extrato etanólico de *Udotea flabellum* na dose 500 mg/kg administrada via oral após cálculo de erro-padrão dos 3 experimentos. 52
- Figura 21. Gráfico de redução de parasitemia (média  $\pm$  desvio padrão) do extrato de *S. schroederi* na dose 500 mg/kg administrada via oral após cálculo de erro-padrão dos 3 experimentos. 52

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1. Casos confirmados de Malária, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas, 1990-2009.	19
Quadro 2. Cálculo para determinação da porcentagem de inibição de parasitemia.	42
Tabela 1. Resultados do rendimento dos extratos etanólicos das espécies <i>Gracilaria birdiae</i> , <i>Udotea flabellum</i> e <i>Spatoglossum schroederi</i> após a primeira extração.	38
Tabela 2. Resultados dos rendimentos em gramas e em porcentagem após três extrações sucessivas com etanol.	43
Tabela 3. Atividade <i>in vitro</i> dos extratos de 3 espécies de algas marinhas contra a cepa cloroquina-sensível do <i>P. falciparum</i> (3D7).	44
Tabela 4. Citotoxicidade e índice de seletividade em macrófagos e linhagem celular BGM após incubação com os extratos de <i>Gracilaria birdiae</i> , <i>Spatoglossum schroederi</i> e <i>Udotea flabellum</i> .	48
Tabela 5. Supressão da parasitemia do <i>Plasmodium berghei</i> em animais infectados e média da sobrevivência dos animais após a realização dos três experimentos .	50
Tabela 6. Média de sobrevivência dos animais $\pm$ D.P após a realização dos três experimentos.	50
Tabela 7. Supressão <i>in vivo</i> da parasitemia (5° dia) do <i>P. berghei</i> após administração dos extratos etanólicos de <i>Gracilaria birdiae</i> , <i>Udotea flabellum</i> e <i>Spatoglossum schroederi</i> .	51
Tabela 8. Supressão <i>in vivo</i> da parasitemia (7° dia) do <i>P. berghei</i> após administração dos extratos etanólicos de <i>Gracilaria birdiae</i> , <i>Udotea flabellum</i> e <i>Spatoglossum schroederi</i> .	51

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

OMS	Organização Mundial de Saúde
WHO	World Health Organization
CI <sub>50</sub>	Concentração Inibitória para 50% das células
DL <sub>50</sub>	Dose letal para 50% das células
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
MTT	Metiltiazoltetrazólio
DMSO	Dimetilsulfóxido
TWEEN 20	Polyoxyethylene sorbitan mono-laurate
SBF	Soro Bovino Fetal
BGM	Buffallo Green Monkey

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	15
1.1 A malária no mundo	16
1.2 A malária no Brasil	16
1.3 A caracterização da doença	20
1.4 O agente etiológico	20
1.5 O vetor	21
1.6 Ciclo biológico	21
1.7 Ciclo biológico e a terapêutica	23
1.8 Controle da malária e triagem de novos antimaláricos	24
1.9 Resistência do parasito aos antimaláricos usuais	26
1.10 Produtos naturais e a busca por novos antimaláricos	29
1.11 Considerações sobre as espécies alvo de estudo	30
<b>2 JUSTIFICATIVA</b>	32
2.1 A busca por novos medicamentos contra a malária	32
2.2 Escolha das algas objeto de estudo	34
<b>3 OBJETIVOS</b>	35
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	36
4.1 Coleta e processamento das algas marinhas <i>Gracilaria birdiae</i> , <i>Spatoglossum schroederi</i> e <i>Udotea flabellum</i>	36
4.2 Obtenção do extrato bruto das algas marinhas <i>Gracilaria birdiae</i> , <i>Spatoglossum schroederi</i> e <i>Udotea flabellum</i>	37
4.3 Animais e comitê de ética	38
4.4 Cultura do parasito e testes antimaláricos <i>in vitro</i> – <i>P. falciparum</i>	38
4.5 Ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i> e índice de seletividade	39
4.6 Ensaio de toxicidade aguda <i>in vivo</i>	40
4.7 Ensaio antimalárico <i>in vivo</i> - <i>Plasmodium berghei</i>	41
4.8 Análise estatística	42
<b>5 RESULTADOS</b>	43
5.1 Extração com o solvente etanol	43
5.2 Testes antimaláricos <i>in vitro</i>	43

5.3 Ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i> e índice de seletividade	44
5.3 Ensaio de toxicidade aguda <i>in vivo</i>	48
5.4 Ensaio antimalárico <i>in vivo</i> – <i>Plasmodium berghei</i>	48
<b>6 DISCUSSÃO</b>	53
<b>7 CONCLUSÕES</b>	61
<b>8 EXPECTATIVAS E PERSPECTIVAS DO ESTUDO</b>	62
<b>REFERÊNCIAS</b>	63

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 A malária no mundo

A malária é reconhecida como grave problema de saúde pública mundial, com altos índices de morbidade e mortalidade. Está presente em todos os trópicos, sendo mais de 90% dos casos ocorrendo na África sub-saariana (WHO, 1997). A malária é endêmica também no sudoeste da Ásia, na América do Sul e Central e Oceania (fig 1). Em 2008, foram estimados cerca de 247 milhões de casos de malária entre 3,3 bilhões de pessoas em risco em 109 países e territórios onde a malária é atualmente considerada prevalente; 87% desses casos foram reportados na região africana (WHO, 2008).

Considerada a maior doença parasitária do mundo, a malária é responsável por milhões de novas infecções e mortes descritas a cada ano. Dados mais recentes estimam que aproximadamente 300-500 milhões de casos e 1,2-2,8 milhões de mortes a cada ano devido a grande morbi-mortalidade dessa parasitose (CHANDEL; BAGAI, 2011). Do total de mortes, 91% ocorrem na África, e 85% dessas acometem crianças menores de 5 anos (GUANTAI; CHIBALI, 2011).

**Figura 01. Mapa endêmico da transmissão de malária no mundo em 2009.**



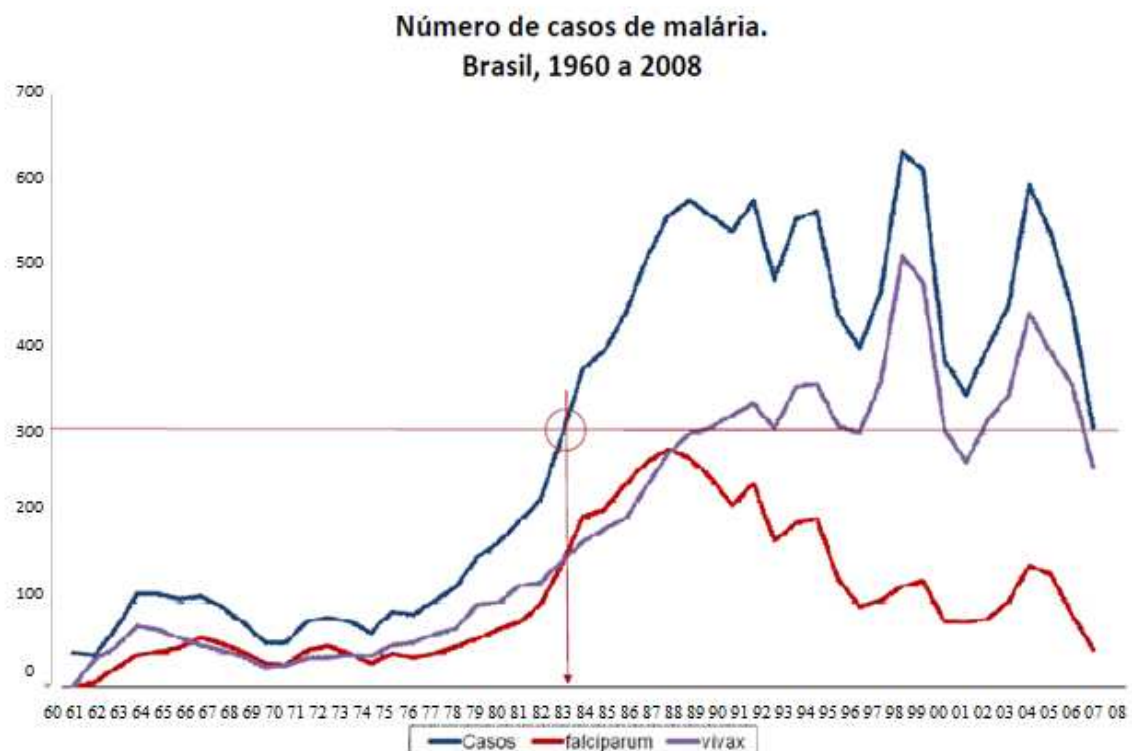
Fonte: Adaptado de Petersen et al., 2011.



## 1.2 A malária no Brasil

Após os países africanos, a Índia e o Brasil são atualmente as regiões de maior endemicidade no mundo (KRETTLI et al., 1991). Na América Latina, o maior número de casos é verificado na Amazônia brasileira. A série histórica relacionada com a malária no Brasil, entre os anos de 1960 e 2008, apresenta variação no número de casos (fig. 2). Fatores como a ocupação desordenada da região amazônica, implantação de projetos de colonização e mineração sem a estrutura necessária contribuíram para a tendência na elevação da doença (BRASIL, 2009).

**Figura 2. Registro de casos de malária e espécies parasitárias (*P. falciparum* e *P. vivax*). Brasil, 1960 a 2008.**



**Fonte: BRASIL, 2009.**

De 2003 a 2008, os casos de malária tiveram uma elevação progressiva, chegando a um aumento de 74% em relação ao número de casos de 2002. A intensa ocupação das periferias das grandes cidades da região, o desmatamento para extração de madeira, criação de gado, agricultura, assentamentos e incremento da atividade de piscicultura de forma

desordenada contribuíram para o aumento da transmissão da doença e para o aumento de criadouros do vetor da malária (BRASIL, 2009).

No Brasil, em 2008, aproximadamente 97% dos casos de malária se concentraram em seis estados amazônicos: Acre, Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia e Roraima. A maioria dos casos ocorre em áreas rurais, mas há registro da doença também em áreas urbanas (em média 15%). Em 2009, os casos de malária no Brasil atingiram o número de 306.908 notificações; desses, 306.342 foram na região amazônica – quase 100% de todos os casos notificados no País. A faixa etária mais acometida no ano de 2008 compreendeu crianças entre 0 e 9 anos, com mais de 9000 casos notificados (BRASIL, 2009).

A região extra-amazônica não é considerada como área endêmica para malária; porém, essas regiões são passíveis de casos importados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003), o que representa grave problema em relação à saúde pública, com um índice de mortalidade bem maior nessas áreas, devido ao atraso no diagnóstico e consequentemente, atraso no tratamento (KRETTLI, 1998). Na região extra-amazônica, mais de 80% dos casos registrados são importados dos Estados pertencentes à área endêmica, continente africano e Paraguai. Com os maiores deslocamentos migratórios ou mesmo turísticos ocorrido nos últimos anos, notifica-se constantemente casos de doenças importadas a partir de zonas endêmicas vizinhas; casos autóctones são destacados em municípios localizados às margens do lago da usina hidrelétrica de Itaipu; áreas cobertas pela Mata Atlântica nos estados do Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo; a região Centro-Oeste, estados de Goiás e Mato Grosso do Sul; e a região Nordeste, estado da Bahia e Piauí (BRASIL, 2009).

Os primeiros relatos de casos autóctones de malária no Brasil datam do século XVI, como uma consequência natural da colonização Européia (COURA et al., 2006). No fim do século XIX, a malária estava presente em todo o território nacional, exceto em alguns estados do sul do país (CAMARGO, 2003). No mesmo período, surgiu uma grande epidemia na Amazônia brasileira. A borracha tornara-se matéria-prima preciosa e as perspectivas de extração do látex e de riqueza imediata, levaram para a Amazônia legiões de nordestinos, dando origem a primeira grande epidemia amazônica de malária. Ainda em função da borracha, o Brasil se comprometeu a construir a estrada de Ferro Madeira-Mamoré, que daria vazão ao látex boliviano (PINTO, 1993). Foi a segunda grande epidemia amazônica de malária testemunhada por Oswaldo Cruz e Carlos Chagas (CHAGAS, 1913).

Nas duas primeiras décadas do século XX a malária estava presente em todas as capitais brasileiras, sendo endêmica em todo o país. Duas grandes epidemias surgiram no Brasil. No início da década de 30, Raymond C. Shannon, entomologista do Serviço de Febre

Amarela, vinculado à Comissão Sanitária Internacional da Fundação Rockefeller, descobriu a larva de um mosquito *Anopheles gambiae* em Natal, capital do Rio Grande do Norte (HOCHMAN et al., 2002). Foi a primeira vez que se encontrava no hemisfério ocidental esse vetor da malária, originário da África tropical (GADELHA, 1995, p. 6). Provavelmente, os aviões franceses que faziam a cada quatro dias, a rota postal França-Natal, via Dakar, serviram de carreadores desse transmissor da malária na África, até então ausente do país.

Pouco depois, verificaram-se os primeiros surtos de malária em Natal que ocupou imediatamente as imediações da estrada de ferro e os canais próximos à foz do Potengi e, foram se disseminando em todo o município de Natal em poucos meses, ocupando um território de 6 mil km<sup>2</sup>. Em 1928, já haviam ocorrido 28 mortes por malária em Natal. Esse número aumentou 12 vezes em 1932. Em um único bairro (Alecrim), 10 mil pessoas adquiriram malária dentre uma população de 12 mil indivíduos. Este fato constituiu uma calamidade pública. Contudo, ações vigorosas dos serviços vigilância em endemias, subsidiados pelo Governo Federal erradicaram o *A. gambiae* de Natal e controlaram a malária, com a utilização dos métodos tradicionais de combate aos criadouros dos mosquitos: drenagens, aterros e uso de querosene em poças d'água. Os trabalhos de combate ao mosquito transmissor da malária nessa ocasião foram organizados pelo Serviço de Febre Amarela e transferidos posteriormente ao Departamento de Saúde do Estado do Rio Grande do Norte (MOTA, 2009).

No entanto, o *A. gambiae* não foi erradicado, apenas retirou-se, seguindo o curso dos rios Apodi e Assu, atravessando a chapada do Apodi e finalmente chegando às margens do rio Jaguaribe no Ceará. No decorrer dos anos seguintes, nessas regiões, foi se proliferando e se expandindo em silêncio sem provocar grandes surtos epidêmicos, "até que, em 1938, causou, no vale do Jaguaribe, no Ceará, talvez a maior epidemia de malária já ocorrida em nosso continente" (DEANE, 1985, p. 90). A luta contra o *A. gambiae* foi intensa, não sobrando sequer um único criadouro na região que não fosse examinado e aspergido com larvicida. Em 1940, o *Anopheles gambiae* viria a ser completamente erradicado do Brasil (CAMARGO, 2003).

Na última década, foram registrados vários focos de malária fora da região Amazônica causados pela presença de indivíduos infectados (BARATA, 1995). Na região Nordeste, destaca-se o estado do Ceará, que apresentou 464 casos autóctones de malária em 2002 (MOTA, 2009). No ano de 2004, os surtos mais importantes ocorreram nos estados do Piauí e do Espírito Santo, com o registro de 150 e 156 casos, respectivamente (VIGILÂNCIA

EM SAÚDE, 2005). No ano de 2009, a região Nordeste foi a segunda maior em número de casos confirmados de malária no Brasil, atingindo a incidência de 5.800 casos (quadro 1).

**Quadro 1. Casos confirmados de Malária, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas, 1990-2009.**

Região e UF	1990	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009*
<b>Região Norte</b>	<b>367.287</b>	<b>522.656</b>	<b>341.964</b>	<b>325.174</b>	<b>392.311</b>	<b>443.912</b>	<b>586.434</b>	<b>533.229</b>	<b>444.053</b>	<b>305.916</b>	<b>297.384</b>
Roraima	174.330	54.074	57.679	71.224	93.852	107.115	118.633	101.646	81.929	49.807	41.362
Acre	14.455	21.560	7.774	9.216	12.264	31.720	57.242	93.863	51.277	27.704	27.552
Amazonas	28.479	96.026	48.385	70.223	141.005	147.579	226.413	185.642	197.141	133.660	98.869
Roraima	24.937	35.874	16.028	8.036	11.818	26.200	31.964	20.646	15.236	10.235	14.943
Pará	109.736	278.204	186.367	149.088	115.510	109.778	123.406	101.763	76.207	69.213	99.531
Amapá	10.677	35.278	24.487	16.257	16.651	20.670	28.059	29.290	21.975	15.132	14.999
Tocantins	4.673	1.640	1.244	1.130	1.211	850	717	379	288	165	128
<b>Região Nordeste</b>	<b>38.914</b>	<b>79.399</b>	<b>39.848</b>	<b>16.607</b>	<b>11.685</b>	<b>14.813</b>	<b>11.447</b>	<b>9.766</b>	<b>6.807</b>	<b>4.906</b>	<b>5.800</b>
Maranhão	34.955	78.818	39.507	16.000	11.432	14.505	11.196	9.519	6.621	4.757	5.685
Piauí	2.436	277	133	64	85	150	69	121	51	50	32
Ceará	774	135	64	464	38	69	76	55	60	22	18
Rio Grande do Norte	140	24	22	13	10	10	17	18	4	6	6
Paraíba	70	20	2	3	5	5	13	7	2	-	7
Pernambuco	132	36	19	9	11	24	21	9	28	38	26
Alagoas	19	12	-	12	5	10	6	4	6	5	7
Sergipe	12	7	5	-	9	4	7	2	2	3	4
Bahia	376	70	96	42	90	36	42	31	33	25	15
<b>Região Sudeste</b>	<b>2.893</b>	<b>647</b>	<b>567</b>	<b>508</b>	<b>464</b>	<b>651</b>	<b>860</b>	<b>783</b>	<b>565</b>	<b>475</b>	<b>264</b>
Minas Gerais	647	187	154	172	114	164	208	145	132	116	67
Espírito Santo	315	95	74	-	79	159	190	118	92	127	44
Rio de Janeiro	132	72	70	111	77	89	104	123	93	70	4
São Paulo	1.799	293	269	225	194	239	358	397	248	162	149
<b>Região Sul</b>	<b>3.840</b>	<b>290</b>	<b>207</b>	<b>237</b>	<b>231</b>	<b>261</b>	<b>293</b>	<b>242</b>	<b>263</b>	<b>124</b>	<b>95</b>
Paraná	3.014	204	146	225	163	173	208	162	205	96	76
Santa Catarina	233	50	42	-	49	52	57	47	41	15	14
Rio Grande do Sul	593	36	19	12	19	36	28	33	17	13	5
<b>Região Centro-Oeste</b>	<b>147.462</b>	<b>12.255</b>	<b>7.176</b>	<b>7.370</b>	<b>5.255</b>	<b>6.802</b>	<b>8.767</b>	<b>6.897</b>	<b>6.961</b>	<b>4.209</b>	<b>3.365</b>
Mato Grosso do Sul	975	238	233	90	60	59	86	76	41	33	34
Mato Grosso	143.853	11.767	6.832	7.085	5.022	6.484	8.437	6.650	6.760	4.081	3.273
Goiás	2.159	160	52	137	173	200	184	113	119	71	36
Distrito Federal	475	90	59	58	-	59	60	58	41	24	22
<b>Região Amazônica</b>	<b>546.095</b>	<b>613.241</b>	<b>388.303</b>	<b>348.259</b>	<b>408.765</b>	<b>464.901</b>	<b>606.067</b>	<b>549.398</b>	<b>457.434</b>	<b>314.754</b>	<b>306.342</b>
<b>Brasil</b>	<b>560.396</b>	<b>615.247</b>	<b>389.762</b>	<b>349.896</b>	<b>409.946</b>	<b>466.439</b>	<b>607.801</b>	<b>550.917</b>	<b>458.649</b>	<b>315.630</b>	<b>306.908</b>

Fonte: adaptado de: todas UF: 1990 - Sistema de Informação Série Histórica de Malária (SHM) - BRAZ RM & TAUIL PL - Informações sobre malária no Brasil: uma proposta de registro em meio magnético [Monografia de Especialização em Saúde Coletiva]. Brasília (DF): Universidade de Brasília, 1999.

Região Amazônica (AC, AM, AP, MA, MT, PA, RO, RR e TO): 2000 a 2002 - Sistema de Informação do Programa Nacional de Controle da Malária (SISMAL). 2003 a 2009 - Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica - Malária (Sivep-Malária).

Região Extra-Amazônica (AL, BA, CE, DF, ES, GO, MG, MS, PB, PE, PI, PR, RJ, RN, RS, SC, SE e SP): 2000 a 2003 - Sistema de Informação do Programa Nacional de Controle da Malária (SISMAL). 2004 a 2009 - Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN).

A demora no diagnóstico e tratamento da malária tem sido decisivo na manutenção da transmissão e gravidade da doença. Vários são os fatores responsáveis por esse atraso: insuficiência de estrutura dos serviços locais de saúde, de laboratórios e de recursos humanos capacitados no diagnóstico e tratamento da malária, baixo controle de qualidade do diagnóstico laboratorial, falta de métodos diagnósticos rápidos para áreas de difícil acesso,

interrupção no abastecimento de medicamentos, presença de portadores assintomáticos e pouco esclarecimento da população sobre a doença, são alguns deles. Esse quadro é preocupante, the antimalarial activity of ethanolic extracts seaweed uma vez que toda a Região não-Amazônica é receptiva para transmissão de malária e os serviços de vigilância em saúde de alguns municípios são carentes de estrutura adequada para o enfrentamento do problema (VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2005).

### 1.3 Caracterização da doença

A malária, causada por protozoários do gênero *Plasmodium*, pode ser descrita como uma doença infecciosa febril aguda, conhecida popularmente como maleita, febre intermitente, paludismo, impaludismo, febre terçã ou febre quartã. Uma fase sintomática inicial, caracterizada por mal-estar, cefaléia, cansaço e mialgia, geralmente precede a clássica febre da malária. O ataque paroxístico inicia-se com calafrios que duram de 15 minutos à uma hora, sendo seguidos por uma fase febril, com temperatura corpórea podendo atingir 41°C ou mais. Após um período de duas a seis horas, ocorre defervescência da febre e o paciente apresenta sudorese profusa e fraqueza intensa. O quadro clínico pode evoluir para formas clínicas de malária grave e complicada, destacando-se forte cefaléia, hipertermia, vômitos, sonolência e convulsões (malária cerebral), insuficiência renal aguda, edema pulmonar agudo, hipoglicemia, disfunção hepática, hemoglobinúria (hemólise intravascular aguda maciça) e choque. No Brasil, onde a malária é hipo ou mesoendêmica, cerca de 1% dos casos pode ir a óbito (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003).

### 1.4 O agente etiológico

Os agentes etiológicos são protozoários do gênero *Plasmodium* (filo Apicomplexa; família Plasmodiidae). Possui cerca de 150 espécies causadoras de malária em diferentes hospedeiros vertebrados; dentre esse número, 4 espécies são responsáveis pela transmissão ao homem: *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale*. No Brasil, apenas as três primeiras estão associadas à malária em humanos.

Após a fase inicial, a febre assume um caráter intermitente, dependente do tempo de duração dos ciclos eritrocíticos de cada espécie de plasmódio: 48 horas para *P. falciparum* e *P. vivax* (malária terçã), e 72 horas para *P. malariae* (malária quartã). Entretanto, a constatação desta regularidade é pouco comum nos dias atuais. De um modo geral, as formas brandas são causadas pelo *P. malariae* e *P. vivax* e as formas clínicas mais graves são causadas pelo *P. falciparum*, especialmente em adultos não imunes, crianças e gestantes que podem apresentar manifestações mais graves da doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003).

### 1.5 O vetor

Os mosquitos vetores da malária são pertencentes à ordem Diptera, infraordem Culicomorpha, família Culicidae, gênero *Anopheles* Meigen, 1818. Este gênero compreende aproximadamente 400 espécies, das quais cerca de 60 ocorrem no Brasil. No País, as principais transmissoras da malária são: *Anopheles (N.) darlingi* Root, 1926; *Anopheles (N.) aquasalis* Curry, 1932; *Anopheles (Nyssorhinchus) albitarsis s.l.* Lynch-Arribáizaga, 1878.

O principal vetor de malária no Brasil é o *A. darlingi*, cujo comportamento é extremamente antropofílico, e dentre as espécies brasileiras, é a mais encontrada picando no interior e nas proximidades das residências. Essa espécie cria-se normalmente em águas de baixo fluxo, profundas, límpidas, sombreadas e com pouco aporte de matéria orgânica e sais. Entretanto, em situações de alta densidade, esse vetor acaba ocupando vários outros tipos de criadouros, incluindo pequenas coleções hídricas e criadouros temporários (BRASIL, 2009).

O *Anopheles darlingi* distribui-se por todo o País, exceto em regiões de altitude elevada (mais de 1000 metros), no sertão nordestino e no Estado do Rio Grande do Sul. Além disso, esse vetor consegue manter altos níveis de transmissão mesmo com densidades muito reduzidas (BRASIL, 2009).

### 1.6 Ciclo biológico

A conexão entre infecção por um protista e a doença foi primeiramente reconhecida na forma de gametócitos de *Plasmodium falciparum*. Posteriormente, Golgi (1885) elucidou o

ciclo sanguíneo assexuado e Ross (1897), a transmissão pelo mosquito do gênero *Anopheles*. Ainda, Saphens e Christophers (1908) propuseram que “o ciclo sexuado começa no sangue quando as condições são desfavoráveis para a continuação do ciclo assexuado” (MCKENZIE; BOSSERT, 1997).

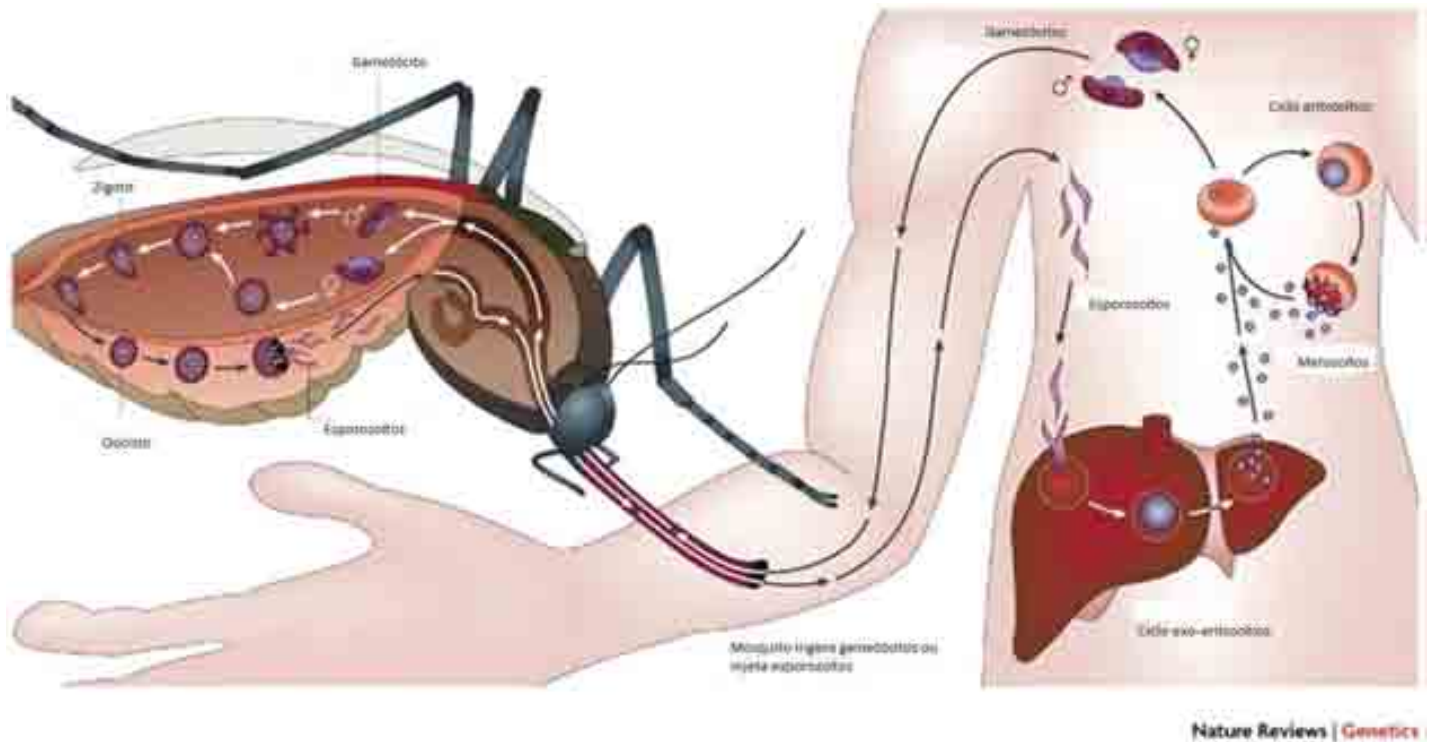
A infecção por *Plasmodium* no hospedeiro vertebrado inicia-se a partir da inoculação de formas conhecidas como esporozoítos presentes na glândula salivar do mosquito *Anopheles* (Diptera; Culicidae) durante o repasto sanguíneo. Tais formas alcançam as células do fígado (hepatócitos), dando início ao ciclo exo-eritrocítico. Receptores específicos participam nesse processo, permitindo a eficiência da invasão e ainda a especificidade da célula hospedeira. É sabidamente conhecido que, uma proteína expressa na superfície dos esporozoítos – a proteína circum-esporozoíto – bem como a proteína TRAP (*thrombospondin-related anonymous protein*) estão intimamente envolvidas nesse processo (HEGGE et al., 2010).

Uma vez dentro dos hepatócitos, diferenciam-se e multiplicam-se em trofozoítos pré-eritrocíticos, os quais se multiplicam assexuadamente por esquizogonia, originando esquizontes teciduais e posteriormente a vários merozoítos (CHEN et al., 2009).

Cada um desses merozoítos, ao saírem dos hepatócitos, invade os eritrócitos, onde se inicia o ciclo eritrocítico assexuado; esse é acompanhado pelo reconhecimento de receptores específicos para que haja a interação dos merozoítos com essas células sanguíneas. Alguns desses receptores já são bastante conhecidos; para o *Plasmodium falciparum*, o principal classe de receptores são as glicoforinas, enquanto que para o *P. vivax*, a glicoproteína do grupo sanguíneo *Duffy* (HANDEL; HORUK, 2009). O desenvolvimento intra-eritrocítico se dá a partir do crescimento e proliferação de parasitos, via esquizogonia, a formas individuais – os merozoítos – os quais rompem as células vermelhas sanguíneas, liberando de 8 a 32 merozoítos (dependendo da espécie) para invadir novas células via interações adesivas múltiplas, envolvendo moléculas da superfície celular do hospedeiro (MCKENZIE; BOSSERT, 1997).

Esse ciclo sanguíneo pode se repetir várias vezes, até que algumas formas merozoítas desenvolvam-se em formas sexuadas, com estágios de transmissão não-replicativos denominados gametócitos, que por sua vez seguirão o seu desenvolvimento no mosquito vetor após o seu repasto sanguíneo em hospedeiro vertebrado, dando origem aos esporozoítos. Na matriz peritrófica (intestino médio do mosquito *Anopheles*) os gametas feminino e masculino – macro e microgameta, respectivamente – podem se unir e formar um zigoto, que por sua vez formará esporozoítos (MCKENZIE; BOSSERT, 1997) (figura 3).

Figura 3. Ciclo biológico do *Plasmodium* no hospedeiro definitivo e intermediário.



Fonte: Adaptado de <http://www.nature.com/nrg/journal/v8/n7/images/nrg2126-f1.jpg>

### 1.7 Ciclo biológico e terapêutica

Sabendo que a malária continua sendo um dos principais problemas de saúde pública no mundo, e a partir do ciclo biológico exposto, um entendimento do mecanismo molecular básico do ciclo assexuado (particularmente o processo da invasão dos merozoítos em eritrócitos) pode contribuir para o desenvolvimento de um novo e eficiente fármaco para prevenir e/ou tratar a malária.

Nesse sentido, a partir do conhecimento do ciclo de vida do parasito, diferentes estratégias de tratamento têm sido propostas, visando à interrupção de sua transmissão; moléculas químicas já conhecidas, como cloroquina (e análogas a aminoquinoleínas), quando combinadas com artemisinina e outros endoperóxidos têm apresentado bons resultados; porém, as escolhas terapêuticas continuam ainda limitadas (FATORUSSO; SCAFATI, 2009).

### 1.8 Controle da malária e triagem de novos antimaláricos



Durante a última década, renovados esforços globais e nacionais para combater a malária levaram a metas ambiciosas. No entanto, o contínuo impacto inaceitável de morbidade e mortalidade da malária aumenta a cada ano, no valor de mais de 800.000 mortes e 250 milhões de casos clínicos anualmente (WHO, 2010).

Mortes por malária no mundo aumentaram de 995.000 em 1980 para um pico de 1.817.000 em 2004, diminuindo para 1.238.000 em 2010. Na África, as mortes por malária aumentaram de 493.000 em 1980 para 1.613.000 em 2004, diminuindo em cerca de 30% para 1.133.000 em 2010. Fora da África, as mortes por malária diminuíram de 502.000 em 1980 para 104.000 em 2010 (MURRAY et al., 2012).

Diante dos números expostos acima, percebe-se que as doenças infecciosas, doenças crônicas e negligenciadas representarão os principais desafios no próximo século. De acordo com o World Health Organization, estima-se que a incidência e a prevalência de doenças parasitárias (como a malária) aumentarão de forma significativa em vários países subdesenvolvidos e em desenvolvimento (WHO, 1997; 1999).

Devido ao número de casos crescentes, culminando em alarmantes números de mortes anuais, inúmeros esforços são destinados para o controle e tratamento da malária, de modo a evitar e /ou minimizar o impacto causado por essa doença.

Atualmente não existem antimaláricos totalmente eficazes. A cloroquina na dose de 300 mg semanais foi utilizada durante muitos anos como método profilático, no entanto esse uso foi interrompido com a emergência de resistência do *Plasmodium falciparum* às 4-aminoquilinas e outras drogas. A utilização de cloroquina associada com outras drogas, como proguanil (BARNES et al., 1991) e mefloquina (GAY et al., 1990; RINGWALD et al., 1990) também falhou como medida terapêutica.

Hoje, a resistência a medicamentos antipalúdicos, tem ameaçado esforços de eliminação da malária e historicamente levou ao ressurgimento em curto prazo de incidência da doença e mortes (PETERSEN; EASTMAN; LANZER, 2011).

O uso de antibióticos, como a doxiciclina, contra o *P. falciparum* (PRADINES et al., 2000), sozinho ou em combinação com mefloquina, atovaquona, artesunato ou artemether, também foi proposto nas últimas décadas (LOOAREESUWAN et al., 1994; 1996; NABANGCHANG et al., 1996). Porém, a gravidade de seus efeitos tóxicos em humanos não está bem elucidada.

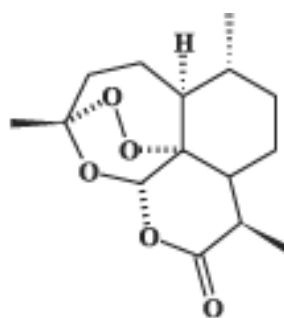
Os estudos mais atuais concentram-se no desenvolvimento de uma vacina efetiva contra a malária. As investigações nesse âmbito tem tomado muitas décadas, no entanto, muitos desafios (por exemplo, superar o problema de polimorfismo antigênico de parasitos) é

um dos pontos cruciais para o surgimento desse método de imunização. É provável que, para que as vacinas sejam eficazes, seja necessário que elas contenham antígenos de diferentes estágios do ciclo de vida do parasito, o que dificulta o processo de obtenção das mesmas (GREENWOOD; TARGETT, 2011).

A OMS tem incentivado pesquisas e sugerido a utilização de novas drogas a partir de produtos naturais para o tratamento de doenças (WHO, 1978; 1995; 1997; 1999). Estima-se que o número de espécies vegetais utilizadas na medicina popular em todo o mundo tenha atingido o valor de em 250.000 (FARNSWORTH; SOEJARTO, 1991). Na China, por exemplo, existe um programa nacional integrado onde a medicina popular está incluída, o que representa 30%-50% do consumo médico anual (ZHANG, 1996).

A etnofarmacologia (triagem racional com base na seleção de plantas usadas na medicina popular) tem se mostrado promissora. A experiência chinesa na descoberta do potente antimalárico artemisinina (ginghaosu) mostra a importância da medicina tradicional a partir do conhecimento do uso de plantas medicinais (PHILLIPSON, 1986). A artemisinina é um sesquiterpeno que contém endoperóxidos em sua estrutura (característica rara entre os vegetais), além de não possuir anel heterocíclico com nitrogênio como na maioria dos antimaláricos (PETERS, 1985) (figura 4).

**Figura 4. Estrutura química da artemisinina**



**Fonte: Rodrigues et al., 2006.**

A pesquisa de antimaláricos a partir de produtos naturais possui registros datados de 1947, como resultado de investigações ocorridas durante a Segunda Guerra Mundial. Nesse período, 600 amostras de plantas de 126 famílias foram testadas *in vivo* utilizando o modelo aviário de malária (*Plasmodium gallinaceum*). Trinta gêneros das famílias de plantas

Simaroubaceae e Amoryllidaceae, mostraram atividade antiplasmódica (CONDON-RALL, 1991).

Basicamente, dois fatores diferenciam os produtos naturais dos químicos sintéticos: a diversidade molecular e a atividade biológica. A diversidade molecular dos produtos naturais é superior àquela oferecida pela química combinatória, que apesar de considerável avanço, é ainda limitada quanto ao seu âmbito (NISBET; MOORE, 1997).

Muitos compostos naturais observados são constituídos por moléculas ativas relativamente pequenas que apresentam variadas propriedades farmacológicas. Os compostos ativos provenientes de triagens com produtos naturais podem ser ainda melhorados por meio da química medicinal ou ainda por técnicas de uso associado com demais drogas, como aconteceu com a artemisinina. O melhoramento feito a partir de modificações químicas na artemisinina resultou no análogo *artemether*, que é clinicamente efetivo no tratamento da malária cerebral (HIEN et al, 1996; VAN HENS BROEK et al., 1996).

O redescobrimento das propriedades medicinais das plantas vem se tornando mais intenso, e apesar de algumas objeções, os produtos naturais continuam contribuindo para o desenvolvimento de novas drogas. Nos últimos anos, a maioria das companhias farmacêuticas em todo o mundo tem investido enormemente em tecnologias visando o desenvolvimento de novos medicamentos. Artífícios como a robótica, bem como enzimas e receptores específicos e ressonância magnética nuclear, são cada vez mais utilizados em pesquisas e análises de extratos brutos, frações parcialmente purificadas e substâncias puras isoladas dentro do espectro de desenvolvimento de novas drogas (PHILLIPSON, 1999). Nessa perspectiva, buscamos protótipos para o desenvolvimento de antimaláricos alternativos que possuam considerável ação anti-plasmódica, baixa toxicidade e de baixos custos para a população.

### 1.9 Resistência do parasito aos antimaláricos usuais

Apesar de várias drogas antimaláricas disponíveis atualmente no mercado, a resistência do parasito, principalmente o *Plasmodium falciparum* aos antimaláricos usuais, é um dos principais fatores responsáveis pela expansão da malária nos últimos 30 anos, levando assim a um aumento da necessidade de novos medicamentos antiplasmódicos. A resistência generalizada aos inseticidas disponíveis, guerras e deslocamentos maciços de populações, dificuldades na obtenção de financiamento sustentado, a falta de participação da comunidade

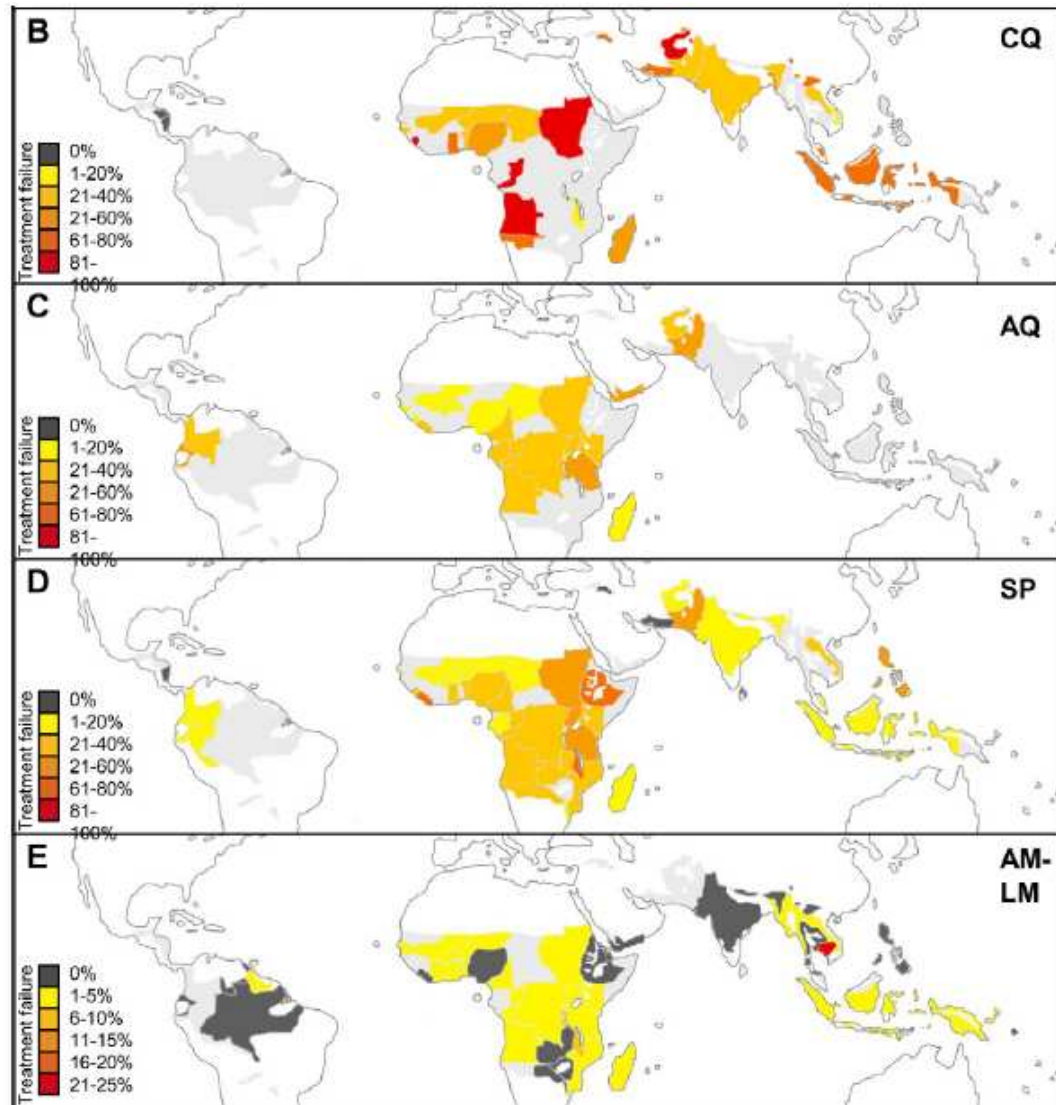
e finalmente, o aparecimento de cepas resistentes à cloroquina no Sul da Ásia e América do Sul por volta de 1960 são fatores que contribuíram para o perfil de resistência atual (PETERSEN; EASTMAN; LANZER, 2011).

Antes do surgimento da resistência do *P. falciparum* à cloroquina, essa droga era utilizada para as quatro espécies de plasmódios que parasitam o homem. A resistência aos antimaláricos tem sido documentada para *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. malariae*, sendo rara a resistência ocorrente nas duas últimas espécies. Hoje, além da cloroquina, o *P. falciparum* apresenta resistência a diversos outros antimaláricos usados correntemente, como amodiaquina, mefloquina, quinina e sulfadoxina–pirimetamina, proguanil (GAY et al., 1990; RINGWALD et al., 1990; BARNES et al., 1991; WERNSDORFER, 1991; TRAPE et al., 1998) exceto para artemisinina e seus derivados (figura 5).

Atualmente, o tratamento mais eficaz para a malária são terapias combinadas com artemisinina (ACTs), que combinam um derivado semi-sintético da artemisinina, um composto químico isolado da planta *Artemisia annua*, associado com uma droga de classe química distinta. Essa terapia combinada compensa as fracas propriedades farmacocinéticas da artemisinina, aumenta a eficácia do tratamento, e acredita-se que ocorra a redução a emergência de parasitos resistentes à droga (EGAN; KASCHULA, 2007).

Porém, em relatos recentes foi observado o surgimento de parasitos resistentes à artemisinina no sudeste da Ásia, o que poderia inviabilizar os esforços correntes para a eliminação/erradicação da malária, e novamente, promover um aumento de casos e mortes causados pela doença; contudo, esses relatos de resistência ainda não representam impacto epidemiológico. O surgimento e a propagação de resistência a drogas não só leva a um aumento nas falhas do tratamento e da mortalidade, mas também a um aumento nos custos associados com o tratamento do indivíduo afetado e ainda, geram custos onerosos para o governo (gastos com o controle de vetores, unidades de saúde, educação e pesquisa) (SACHS; MALANEY, 2002).

**Figura 5. Representação gráfica da porcentagem de falha terapêutica no tratamento para malária no mundo (2000-2010). Legenda: (B) Falha do tratamento com cloroquina (CQ); (C) Falha do tratamento com amodiaquina (AQ); (D) Falha do tratamento com sulfadoxina-pirimetamina (SP); (E) Falha do tratamento com artemether-lumefantrina (AM-LM).**



Fonte: Petersen et al., 2011.

Em resumo, o surgimento de parasitos resistentes aos fármacos usuais é um dos principais fatores limitantes nas estratégias de controle da malária. Para isso, um conhecimento mais profundo dos padrões de resistência regionais aos fármacos, a total compreensão dos mecanismos de ação desses fármacos, a possibilidade de resistência cruzada entre as diversas classes de fármacos utilizadas e a elucidação de marcadores genéticos para a vigilância da resistência são essenciais para um tratamento terapêutico eficaz e efetivo (PETERSEN; EASTMAN; LANZER, 2011).

## 1.10 Produtos naturais e a busca por novos antimaláricos

Considerando as limitações dos antimaláricos usuais, é consenso atual a necessidade do desenvolvimento de novos medicamentos contra a malária. Tal abordagem se beneficia do conhecimento etnofarmacológico e/ou de quimiosistemática usado na medicina tradicional em áreas malarígenas, permitindo assim uma avaliação extensiva dos produtos naturais potencialmente ativos.

Produtos naturais de origem marinha tem recentemente sido interesse em pesquisa, devido às potenciais atividades farmacológicas observadas nos mesmos (KIM et al., 2007). Uma importante fonte de moléculas com inúmeras atividades biológicas pode ser encontrada nas algas marinhas.

A maioria das atividades farmacológicas encontradas nas algas são relacionadas com propriedades antimicrobiana, (FINDLAY; PATIL, 1984), antitumoral (KONIG; WRIGHT, 1996) e imunomoduladoras (KOTRBACEK et al., 1994), além da presença de vários componentes bioativos com atividade antiviral (WITVROUW; CLERCQ, 1997), ação antidiabética (IWAI, 2008) e antiangiogênica (CUMASHI, 2007), efeitos inibitórios sobre lipases digestivas (BEN et al., 2008), atividade antioxidante com a redução e inibição de ROS (KANG et al., 2004), atividade antibacteriana contra bactérias gram-positivas e negativas (SIDDIQUI, 1993) e redução de edema de orelha em camundongos (KHAN et al., 2008).

Ainda, polissacarídeos sulfatados possuem um complexo grupo de macromoléculas com importantes atividades biológicas, dentre elas as fucoidanas. Tais polissacarídeos obtidos da alga *Fucus vesiculosus* relacionam-se com o papel de inibir a ligação dos esporozoítos a superfície dos hepatócitos e assim, a invasão dentro dessas células (PANCAKE et al., 1992); fucoidanas também são responsáveis em inibir a invasão e crescimento assexuado de *Plasmodium falciparum in vitro* e a adesão de células parasitadas a receptores do hospedeiro, como CSA e CD36 (BUTCHER et al., 1988; XIAO et al.;1996; CLARK et al.;1997).

A busca por componentes com atividade antiprotozoária tem sido alvo de investigação em estudos mais recentes. Cantillo-Ciau et al., (2010) demonstraram que a alga parda *Lobophora variegata* possui atividade contra os protozoários *Entamoeba histolytica* e *Trichomonas vaginalis*. Em outra investigação, foi visto que algumas espécies de algas vermelhas possuem componentes bioativos com potencial efeito antimalárico (LANE et al., 2009).

Orham et al., (2006) demonstraram 5 extratos etanólicos de algas das espécies *Cladophora glomerata*, *Dictyota dichotoma*, *Scinaia furcellata*, *Sargassum natans* e *Ulva lactuca* com atividade antiplasmódica, sendo a alga marinha *Sargassum natans* a mais potente quanto ao feito antimalárico observado.

As algas da espécie *Undaria pinnatifida* possuem um polissacarídeo sulfatado – fucoidan – com propriedades farmacológicas *in vitro* contra o *Plasmodium falciparum* (CHEN et al., 2009). Ainda, estudos com extratos etanólicos das algas *Caulerpa toxifolia* e *Caulerpa peltata* demonstraram atividade *in vitro* contra o *Plasmodium falciparum* (RAVIKUMAR et al., 2011).

Diante da necessidade do desenvolvimento de novos medicamentos na terapêutica da malária, e de acordo com os estudos mostrando a variedade de espécies de algas marinhas relacionadas com atividade antiplasmódica, o enfoque do nosso trabalho relaciona-se com a bioprospecção, pela primeira vez, de novos produtos naturais obtidos de algas marinhas no litoral do Rio Grande do Norte, na busca de possíveis candidatos promissores no desenvolvimento de antimaláricos.

### 1.11 Considerações sobre as espécies utilizadas neste estudo

A alga vermelha *Gracilaria birdiae* Plastino & E.C. Oliveira, pertence à divisão Rhodophyta, classe Florideophyceae, ordem Gracilariales, família Gracilariaceae. Essa espécie é frequentemente encontrada sobre substratos duros no litoral do nordeste do Brasil, principalmente nas zonas médiolitoral e infralitoral; está distribuída desde o Estado do Ceará até o limite sul do Estado do Espírito Santo, sendo amplamente exportada para a produção de ágar. Sua estrutura vegetativa é caracterizada por um talo ereto na forma cilíndrica com 2,3 mm de diâmetro, podendo alcançar até 46 cm de altura (PLASTINO; OLIVEIRA, 1992) (fig.6).

A alga marrom *Spatoglossum schroederi* (C.Agardh) Kutzing, representante da divisão Phaeophyta, classe Phaeophyceae, ordem Dictyotales e família Dictyotaceae possui o talo foliáceo ereto, marrom-esverdeado e em forma de fita larga, crescendo por um meristema apical e com altura de 20 a 30 cm. É fixa ao substrato por uma massa rizoidal, sendo ramificada dicotômica e irregularmente, de forma que um dos lados se desenvolve mais que o outro (fig.7) (ICB).

As fitas têm largura de até 2,5 cm abaixo das dicotomias e apresentam espessura de 180-215 µm, com 4 ou 5 camadas de células de tamanho irregular, sendo que as células das camadas mais externas são em geral maiores que as de camadas mais internas. Ao morrer, muda rapidamente de cor, passando para um tom verde. Seu hábitat compreende o interior de baías, em costões rochosos com blocos soltos, crescendo a pouca profundidade nas poças entre as pedras, nunca ficando descobertas na maré baixa (ICB).

A alga verde *Udotea flabellum* (J. Ellis & Solander) J.V. Lamouroux, pertence à divisão Chlorophyta, classe Bryopsidophyceae, ordem Bryopsidales, família Udoteaceae. Cresce isoladamente, possui talo calcificado de aspecto laminar-achatado, presa ao substrato por uma porção basal bulbosa (MARINHO-SORIANO, 2009). Possui distribuição mundial, ocorrendo na América do Norte (Flórida, México, e Carolina do Norte), América Central, Ilhas Caribenhas, África, ilhas do Oceano Índico, Ásia, Austrália, Nova Zelândia e América do Sul (Brasil, Colômbia e Venezuela). No Brasil, ocorrem nos Estados de Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Bahia, Espírito Santo e Arquipélago de Fernando de Noronha (IB, USP) (fig.8).

**Figura 6. Alga vermelha *Gracilaria birdiae*.**



**Fonte: Marinho-Soriano, 2009.**



**Figura 7. Alga marrom *Spatoglossum schroederi*.**



**Fonte: Marinho-Soriano, 2009.**

**Figura 8. Alga verde *Udotea flabellum*.**



**Fonte: Marinho-Soriano, 2009.**

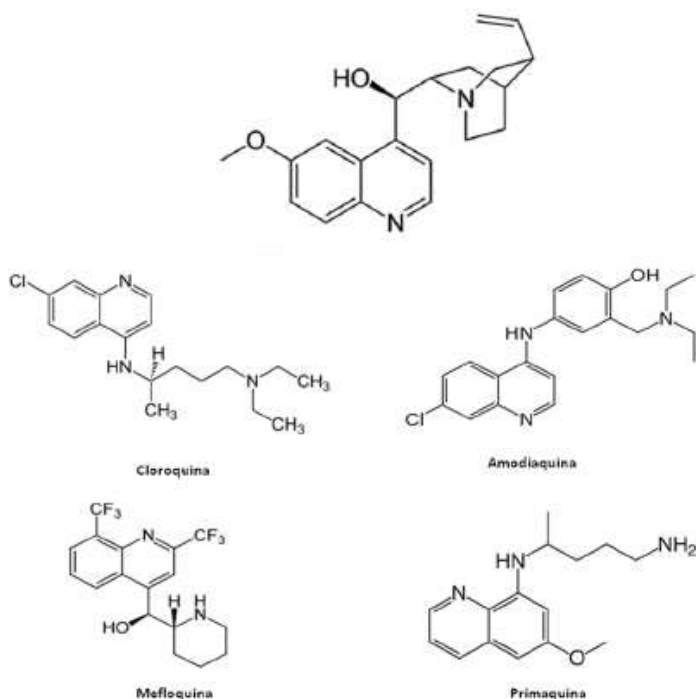
## **2 JUSTIFICATIVA**

### **2.1 A busca por novos medicamentos contra a malária**

Os avanços mais significativos na busca de novos medicamentos contra a malária têm sido realizados com a introdução de componentes naturais, sendo os principais antimaláricos em uso derivados de plantas; esse fato pode ser verificado através de uma

retrospectiva histórica. A malária, por exemplo, foi a primeira doença a ser tratada com medicamentos derivado de um princípio ativo isolado de um componente natural, a quinina, isolada em 1820 (figura 9), e ainda no século XX, muito dos medicamentos ativos foram desenvolvidos baseado na estrutura do anel quinoléico (FATTORUSSO; SCAFATI, 2009). Desse modo, pesquisas envolvendo fármacos e moléculas isoladas com propriedades terapêuticas passaram a ser alvo de estudo na busca de um possível método de prevenção e ainda tratamento da malária.

**Figura 9.** Estrutura da quinina, alcaloide presente nas plantas *Cinchona calisaya* e *C. succirubra* e de antimaláricos sintetizados a partir do seu anel quinoléico.



Os fármacos podem ser descritos como moléculas de estrutura determinada com ações biológicas sobre os sistemas fisiológicos e estados patológicos, cujos efeitos secundários não desejados são bem estabelecidos, constituindo uma forma de terapia medicinal que vem crescendo notadamente nestes últimos anos (YUNES; PEDROS; FILHO, 2001). Os fármacos são considerados xenobióticos e muitos são amplamente metabolizados pelos seres humanos (GOODMAN, 2006). Dentre os estudos com os fármacos, estão as pesquisas com os fitoterápicos, que crescem gradativamente devido a pesquisa farmacêutica

na área, o que permitiu um melhor controle de qualidade de fármacos baseado na moderna tecnologia de identificação, determinação e quantificação de compostos químicos, tornando possível a fabricação de fitofármacos seguros, eficazes e de efeito totalmente reprodutível.

Ainda, os avanços na pesquisa em níveis farmacológico, toxicológico e molecular, permitiram constatar que esses apresentam um mecanismo de ação total ou parcialmente esclarecido, com avaliação toxicológica segura, e estudos de farmacologia pré-clínica e farmacologia clínica realizados segundo as normas que regem os processos de validação de fármacos puros (YUNES; PEDROS; FILHO, 2001).

## 2.2 Escolha das algas objeto de estudo

A escolha pelas algas para o determinado estudo baseou-se em critérios como a sua ocorrência no Estado, facilidade de obtenção, sazonalidade e principalmente na quimiossistemática, envolvendo os constituintes prévios presentes e as propriedades farmacológicas observadas em estudos anteriores. Diversos trabalhos na literatura mundial mostram que a alga marrom *Spatoglossum schroederi* possui um polissacarídeo sulfatado – chamadas fucoidanas – e esse mesmo polissacarídeo foi observado em algas da espécie *Undaria pinnatifida* com atividades farmacológicas *in vitro* contra o *Plasmodium falciparum* (CHEN et al., 2009); sendo assim, apesar de gênero distinto, a alga *Spatoglossum schroederi* possui o mesmo componente bioativo apresentado na alga do gênero *Undaria*, o que pode sugerir a mesma ação farmacológica observada para *U. pinnatifida*. Algas do gênero *Gracilaria* destacam-se no Estado por possuir importância econômica (BEZERRA, 2008), e estudos preliminares também apontam para a presença de componentes bioativos em algas vermelhas que apresentam potencial efeito antimalárico (LANE et al., 2009).

### 3 OBJETIVOS

De acordo com o exposto acima, o objetivo geral deste estudo consiste em avaliar a atividade antimalárica das algas marinhas *Gracilaria birdiae*, *Spatoglossum schroederi* e *Udotea flabellum* usando modelos experimentais de malária murina e humana, seguindo os seguintes objetivos específicos:

- Obtenção de extratos etanólicos das algas marinhas *Gracilaria birdiae*, *Spatoglossum schroederi* e *Udotea flabellum*;
- Avaliar a atividade antimalárica *in vitro* contra a cepa cloroquina- sensível 3D7 *Plasmodium falciparum* e *in vivo* (modelo murino – *Plasmodium berghei*) dos extratos etanólicos das algas *Gracilaria birdiae*, *Spatoglossum schroederi* e *Udotea flabellum*;
- Avaliar a citotoxicidade *in vitro* dos extratos etanólicos das algas *Gracilaria birdiae*, *Spatoglossum schroederi* e *Udotea flabellum* usando linhagens celulares primária (macrófagos) e células de linhagem secundária (células renais de macaco - BGM);
- Avaliar a toxicidade aguda *in vivo* dos extratos das referidas algas em camundongos *Swiss*.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Coleta e processamento das algas marinhas *Gracilaria birdiae*, *Spatoglossum schroederi* e *Udotea flabellum*

As algas marinhas das espécies *Gracilaria birdiae*, *Spatoglossum schroederi* e *Udotea flabellum* foram coletadas manualmente em maré de sizígia nas praias de Búzios, litoral sul do RN e Rio do Fogo, praia do litoral norte do Estado, no período entre março e novembro de 2011 (figuras 10 e 11). Após a coleta das algas, as mesmas foram lavadas três vezes com água corrente para retirada de areia e epífitas, secas em temperatura ambiente por 48 horas (até a estabilização do peso), e trituradas com nitrogênio líquido para obtenção de um pó fino (figura 12).

**Figura 10. Local de coleta da alga vermelha *Gracilaria birdiae*. Praia do Rio do fogo, RN.**



**Fonte: arquivo pessoal, 2011.**

**Figura 11. Local de coleta das algas *Udotea flabellum* e *Spatoglossum schroederi*. Praia de Búzios, RN.**



**Fonte: arquivo pessoal, 2011.**

**Figura 12: Processo de obtenção do pó fino das algas após trituração com nitrogênio líquido.**



**Fonte: arquivo pessoal, 2011.**

#### 4.2 Obtenção do extrato bruto das algas marinhas *Gracilaria birdiae*, *Spatoglossum schroederi* e *Udotea flabellum*

Os extratos brutos foram obtidos ao partir do pó obtido de cada alga, o qual foi submetido à maceração com solvente lipofílico etanol (volume suficiente para cobrir todo o pó para extração – q.s.p.), por o período de 24 horas, com agitação em banho de ultrassom (sem aquecimento) por um período de uma hora. Decorridas as 24 horas, os extratos foram filtrados, e o sobrenadante da filtração foi submetido à concentração em evaporador rotativo (temperatura  $45^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ ). Para avaliar a afinidade do extrato com relação ao solvente, bem como decaimento de massa (gramas) de cada extração, três extrações sucessivas de 24 horas foram realizadas, sendo apenas a primeira extração de 24 horas utilizada para os testes (figura 13).

**Figura 13. Evaporador rotativo utilizado para obtenção de extratos brutos.**



**Fonte: arquivo pessoal, 2011.**

Após o término das extrações, a coloração observada dos extratos variaram entre tonalidades de verde escuro a verde. Cada extrato bruto foi submetido à secagem residual de solvente em capela de exaustão, seguidos de pesagem para obtenção do rendimento dos mesmos, conforme tabela abaixo (tabela 1).

**Tabela 1. Resultados do rendimento dos extratos etanólicos das espécies *Gracilaria birdiae*, *Udotea flabellum* e *Spatoglossum schroederi* após a primeira extração.**

Nome da espécie da alga	Peso seco do pó após triturado (g)	Massa obtida das algas após a primeira extração (g)	Rendimento das algas após a primeira extração (%)
<i>Gracilaria birdiae</i>	208,58	2,13	1,02
<i>Udotea flabellum</i>	268,50	2,39	0,89
<i>Spatoglossum schroederi</i>	196,31	4,73	2,22

#### 4.3 Animais e comitê de ética

Fêmeas de camundongos *Swiss* com 6-8 semanas de idade foram utilizadas para o ensaio de toxicidade aguda e para o estudo *in vivo*. Os animais foram obtidos do biotério da Universidade Federal do Rio Grande do Norte e receberam água e alimento *ad libitum*. Seu uso foi aprovado pelo comitê de ética para uso de animais (CEUA – UFRN n° 043/2010).

#### 4.4 Cultura do parasito e testes antimaláricos *in vitro* – *P. falciparum*

A cultura do parasito foi realizada seguindo metodologia descrita por Trager e Jensen (1976). A cepa 3D7 cloroquina-sensível de *Plasmodium falciparum* foi mantida em cultura contínua em eritrócitos humanos do tipo A+ usando meio RPMI 1640 (Sigma Chemical Company, St. Louis, U.S.A.) suplementado com 10% de soro humano. Para o teste, a cultura foi sincronizada com sorbitol para predominância de trofozoítos a 1-2% de parasitemia e 3%

de hematócrito, e as amostras dos extratos das algas foram diluídas em Tween 20 – 2% na concentração estoque de 20 mg/ml, e posteriormente diluídas em meio completo para obtenção das concentrações de teste (100 a 1,56 µg/ml).

Placas de 96 poços foram incubadas com 180 µl de hemácias infectadas com a cepa 3D7 e 20 µl dos extratos nas referidas concentrações por 48 horas a 37°C. Cada concentração foi testada em triplicata. O controle positivo com cloroquina (antimalárico de referência) na concentração de 2,5 µg/ml (sete diluições 1:3) e o controle negativo (apenas meio de cultura e hemácias) foram utilizados no experimento. Após as 48 horas, esfregaços sanguíneos foram realizados e corados com Giemsa para observação da parasitemia de cada poço. O efeito antiparasitário foi medido por percentagens de inibição de crescimento do parasito em relação ao grupo controle, ou seja, parasitos cultivados em meio livre de droga (CARVALHO; KRETTLI, 1991).

#### 4.5 Ensaio de citotoxicidade *in vitro* e índice de seletividade

Para esse ensaio, macrófagos de camundongos Swiss e células renais de macaco verde (*Buffallo Green Monkey* – BGM) foram utilizadas. Os macrófagos foram obtidos no momento do uso, a partir da coleta com solução salina fosfatada (PBS) estéril gelada do exsudato da cavidade peritoneal dos camundongos. Células BGM foram mantidas em cultura contínua com meio de cultura (RPMI 1640 Sigma Chemical Company, St. Louis, U.S.A.) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SBF, Gibco) em atmosfera de microaerofilia (5% CO<sub>2</sub>) a 37°C. A citotoxicidade dos extratos etanólicos foi determinada usando o ensaio colorimétrico metiltiazoltetrazólio – MTT (MOSMANN, 1983).

Para o ensaio com os macrófagos, após a centrifugação do exsudato peritoneal, o sobrenadante foi desprezado e as células foram ressuspendidas em 5 ml de meio RPMI sem SBF para contagem de macrófagos em câmara de Neubauer. Para cada poço foi aplicado  $1 \times 10^5$  células. A placa foi incubada em estufa de CO<sub>2</sub> a 37° C por 24 horas.

Para o ensaio com as células BGM, as mesmas foram tratadas com tripsina, ressuspendidas em meio RPMI 1640 e distribuídas em 96 poços por placa ( $1 \times 10^4$  células por poço), sendo incubadas em estufa de CO<sub>2</sub> por 24 h a 37°C.

Decorrido esse tempo, para cada teste, os extratos etanólicos (estoque 10 mg/ml, com Tween 2%) foram diluídos em e meio RPMI 1640 sem SBF e testados nas seguintes



concentrações: 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125 e 1,56 µg/ml, em triplicata. Paralelamente, foi realizado um grupo controle constituído de meio RPMI 1640 sem SBF, um grupo controle constituído de Tween 20 – 0,02% (veículo) e um grupo controle positivo (cloroquina, BS Pharma, Belo Horizonte, MG) nas mesmas concentrações utilizadas para os extratos testados.

Após períodos de 24h de incubação com os extratos, 100 µl de MTT (5 mg/ml em meio RPMI 1640 sem SBF e sem vermelho fenol) foram adicionados a cada poço. Após 3h de incubação em estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C, o sobrenadante foi removido e adicionou-se 100 µl DMSO em cada poço. A absorbância de cada poço foi obtida através de leitura em espectrofotômetro com filtro de 570 nm, *background* de 630 nm. Valores de concentração inibitória para 50% das células (CI<sub>50</sub>) no crescimento celular foram obtidos através das curvas de concentração droga-resposta. Os resultados foram expressos em média ± desvio padrão.

De modo a comparar a CI<sub>50</sub> obtidas a partir desse ensaio com as CI<sub>50</sub> obtidas no teste *in vitro*, foi calculado o índice de seletividade (IS), que compreende a razão entre a CI<sub>50</sub> dos testes contra o *Plasmodium falciparum* e a CI<sub>50</sub> obtida a partir da citotoxicidade. Valores obtidos maiores que 10 são atribuídos para extratos com toxicidade ausente ou moderada. Valores menores ou iguais a que 10 indicam toxicidade dos extratos (BÉZIVIN, 2003).

#### 4.6 Ensaio de toxicidade aguda *in vivo*

A toxicidade aguda dos extratos etanólicos das algas marinhas *Gracilaria birdiae*, *Spatoglossum schroederi* e *Udotea flabellum* foi determinada em camundongos sadios, de acordo com protocolo estabelecido pela OECD/OCDE (2001). Grupos de três camundongos (fêmeas) entre 20 e 22 g foram tratados por via oral com dose única de 2000 mg/kg/animal. As doses foram preparadas a partir dos extratos, os quais foram diluídos em Tween 20 a 2% e homogeneizados manualmente; em seguida, foi adicionado água destilada.

As doses foram administradas em um único dia, cada animal recebendo 200 µl dos respectivos extratos. Paralelamente, o grupo controle negativo recebeu apenas Tween 20 – 2% em água destilada, no mesmo volume do grupo teste. Todos os animais foram separados aleatoriamente antes da aplicação das doses, permanecendo em suas respectivas gaiolas até o fim do experimento.

Os animais foram observados dentro o período de 8 dias, compreendendo desde antes da aplicação das doses até o sétimo dia subsequente a aplicação; diariamente, foi verificados o

peso dos animais, aspecto da pelagem, comportamento, frequência cardíaca, frequência respiratória e mortalidade. Essa última foi expressa em percentagem acumulada por grupo, determinando a dose letal mínima para 50% dos animais – DL<sub>50</sub> (OKOKON; NWAFOR, 2008).

#### 4.7 Ensaio antimalárico *in vivo* - *Plasmodium berghei*

Os testes antimaláricos *in vivo* foram realizados de acordo com Peters (1965). Parasitos da cepa NK-65 de *Plasmodium berghei* foram mantidos em camundongos através de passagens sanguíneas de cepa semanalmente, pela via intraperitoneal. Cada animal foi infectado com um inóculo de  $1 \times 10^5$  de hemácias infectadas.

Os animais foram divididos randomicamente em oito grupos com 3 animais, tratados respectivamente com: Tween 20 – 2%, cloroquina (5 mg/kg/animal), extrato etanólico de *Gracilaria birdiae* nas doses de 1000 e 500 mg/kg/animal, extrato etanólico de *Spatoglossum schroederi* nas doses de 1000 e 500 mg/kg/dia e extrato etanólico de *Udotea flabellum* nas doses de 1000 e 500 mg/kg/animal. No dia zero, cada camundongo recebeu inóculo de  $1 \times 10^5$  de eritrócitos infectados. O tratamento foi feito por via oral (*gavage*), diariamente, por 4 dias consecutivos após a infecção. Os extratos foram suspensos em Tween-20 a 2% antes do uso, e posteriormente diluídos para as concentrações de 1000 e 500 mg/kg/animal; dois grupos controles foram utilizados em cada teste, sendo administrado para o controle negativo água destilada e Tween-20 a 2%, enquanto que para o controle positivo foi administrado cloroquina na dose de 5 mg/kg/animal.

No 5° e 7° dia após a infecção, esfregaços sanguíneos foram realizados, corados usando Giemsa e observados em microscópio óptico para determinação da parasitemia. Os resultados foram expressos pelo percentual de redução de parasitemia em relação aos animais não tratados (quadro 2), e o extrato foi considerado ativo quando essa redução foi maior ou igual a 30% (CARVALHO et al., 1991). Os experimentos foram repetidos três vezes para verificar sua reprodutibilidade. A mortalidade cumulativa de cada grupo foi monitorada diariamente por um período de quatro semanas.

**Quadro 2. Cálculo para determinação da porcentagem de inibição da parasitemia.**

$$\% \text{ inibição} = \frac{(\text{parasitemia do controle} - \text{parasitemia grupo teste}) \times 100}{\text{parasitemia do controle}}$$

#### 4.8 Análise estatística

A ANOVA e o Teste de *Tukey* foram usados para análise da parasitemia nos ensaios antimaláricos e o Teste *t* de *Student* para análise das reduções das parasitemias entre os grupos, e da citotoxicidade nos ensaios com macrófagos e células e BGM. O nível de significância estabelecido foi de 5%. O cálculo de  $CI_{50}$  para os testes *in vitro* contra a cepa 3D7 foram calculados no programa Microcal Origin® 5.0.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Extração com o solvente etanol

Com a finalidade de observarmos o comportamento do solvente etanol nas extrações dos constituintes químicos das algas *Gracilaria birdiae*, *Spatoglossum schroederi* e *Udotea flabellum*, três extrações sucessivas de 24 horas cada foram realizadas. Abaixo, a tabela mostra os valores de massa obtidos a partir das extrações.

**Tabela 2. Resultados dos rendimentos em gramas e em porcentagem após três extrações sucessivas com etanol.**

Alga	Peso seco antes da extração (g)	Massa obtida após a primeira extração (g)	Massa obtida após a primeira extração (%)	Massa obtida após a segunda extração (g)	Massa obtida após a segunda extração (%)	Massa obtida após a terceira extração (g)	Massa obtida após a terceira extração (%)
<i>Gracilaria birdiae</i>	208,58	2,13	1,02	0,93	0,44	1,39	0,66
<i>Spatoglossum schroederi</i>	196,16	4,37	2,22	2,40	1,22	1,13	0,57
<i>Udotea flabellum</i>	268,50	2,39	0,89	1,84	0,68	0,95	0,35

### 5.2 Testes antimaláricos *in vitro*

Após a realização dos experimentos, os resultados mostraram que as algas *Spatoglossum schroederi* e *Udotea flabellum* possuem atividade antimalárica significativa. Na concentração de 100 µg/ml, as respectivas reduções de parasitemia para a alga marrom e

verde foram de 70,54 e 54%, sendo consideradas parcialmente ativas (CARVALHO et al., 1991) A alga vermelha *Gracilaria birdiae* apresentou redução de parasitemia de 38,33% para a concentração de 50 µg/ml, sendo também considerada parcialmente ativa (tabela 3).

**Tabela 3. Atividade *in vitro* dos extratos de 3 espécies de algas marinhas contra a cepa cloroquina-sensível do *P. falciparum* (3D7).**

Espécie	Concentração testada (µg/ml)	Redução de parasitemia (%)	CI <sub>50</sub> (µg/ml)	Classificação da atividade (*)
<i>Gracilaria birdiae</i>	50	38,35%	≥ 100	I
<i>Spatoglossum schroederi</i>	100	70,54%	47,90	PA
<i>Udotea flabellum</i>	100	54%	≥ 100	PA

\*Como critério de atividade *in vitro* foi estabelecido que as amostras que inibirem o crescimento dos parasitos de: 80 a 100% = ativas (A); 50 a 79% = parcialmente ativas (PA); < 50% = inativa (I).

### 5.3 Ensaio de citotoxicidade *in vitro* e índice de seletividade

A viabilidade celular das linhagens celulares de macrófagos e células BGM foi determinada a partir da DL<sub>50</sub> de cada extrato das algas testadas A partir da mesma, gráficos foram montados com os resultados obtidos (figuras 14 a 19). De modo a comparar a dose letal observada e a toxicidade contra a cepa 3D7 de *P. falciparum*, também foi avaliado o índice de seletividade (IS), co-relacionando a toxicidade dos extratos das algas *Gracilaria birdiae*, *Spatoglossum schroederi* e *Udotea flabellum* em macrófagos e células renais de macaco verde (BGM) e a concentração inibitória contra o *P. falciparum* (tabela 4).

Figura 14. Gráfico de viabilidade celular (média±desvio padrão do percentual de crescimento celular) de macrófagos com o extrato de *Gracilaria birdiae*.

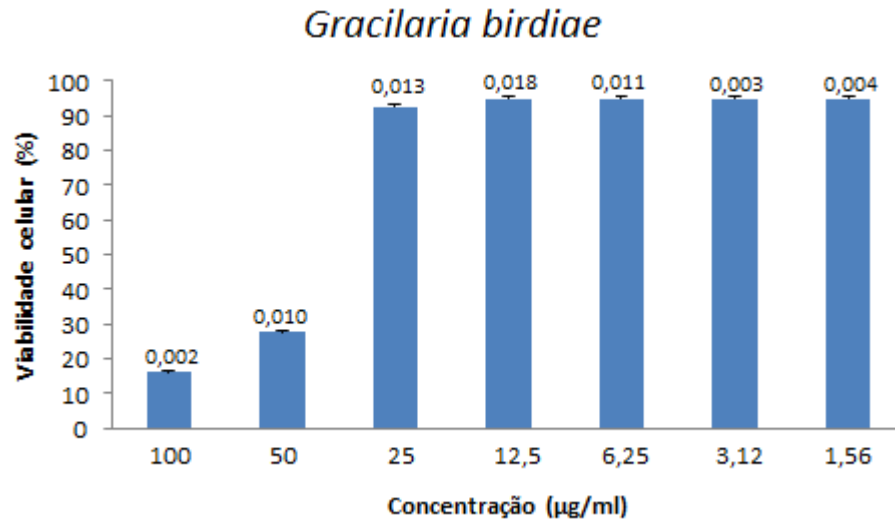


Figura 15. Gráfico de viabilidade celular (média±desvio padrão do percentual de crescimento celular) de macrófagos com o extrato de *Spatoglossum schroederi*.

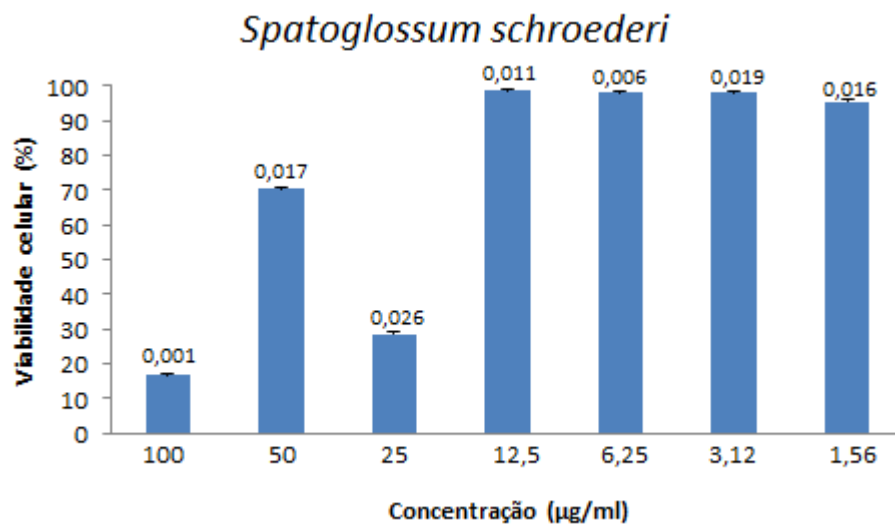


Figura 16. Gráfico de viabilidade celular (média±desvio padrão do percentual de crescimento celular) de macrófagos com o extrato de *Udotea flabellum*.

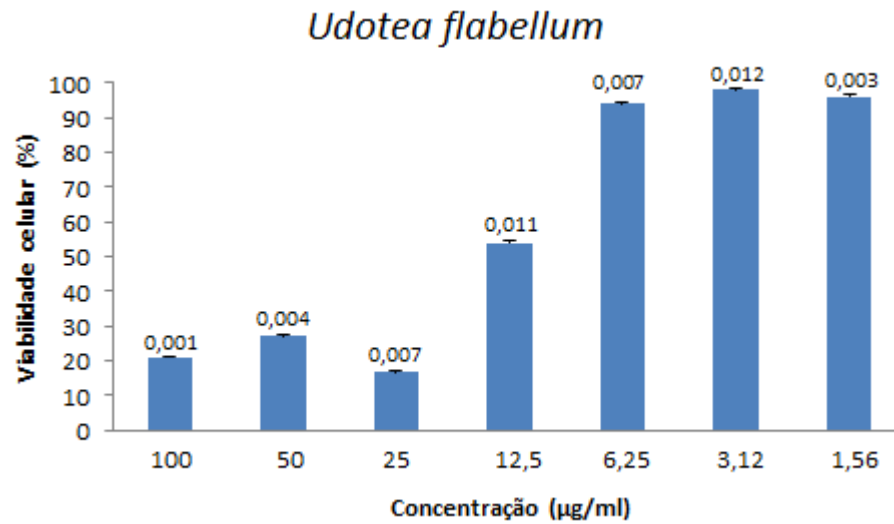


Figura 17. Gráfico de viabilidade celular (média±desvio padrão do percentual de crescimento celular) de células BGM com o extrato de *Gracilaria birdiae*.

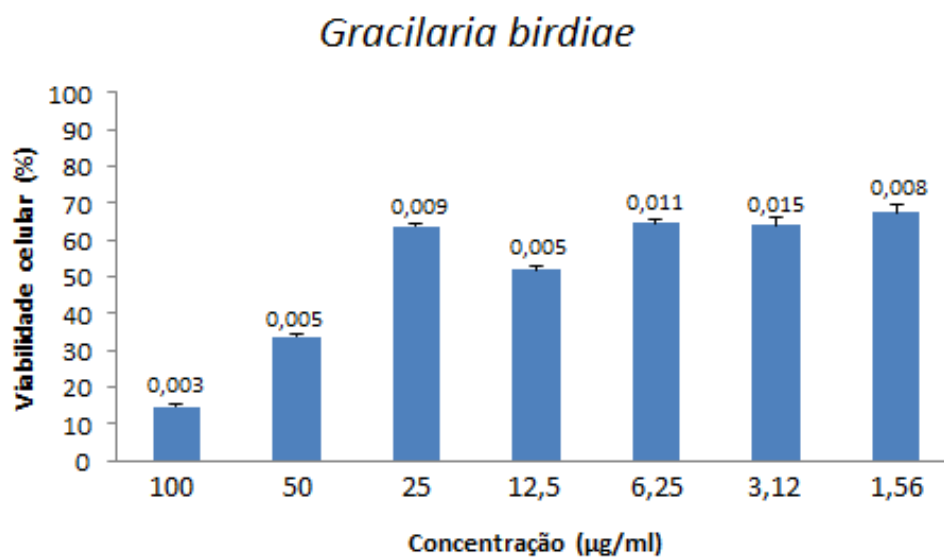


Figura 18. Gráfico de viabilidade celular (média±desvio padrão do percentual de crescimento celular) de células BGM com o extrato de *Spatoglossum schroederi*.

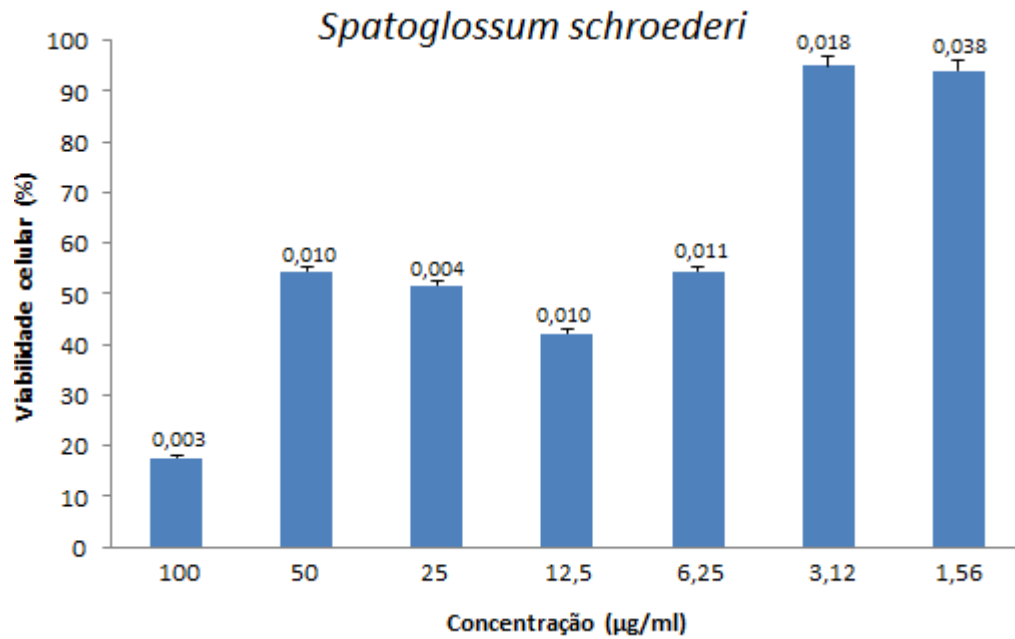
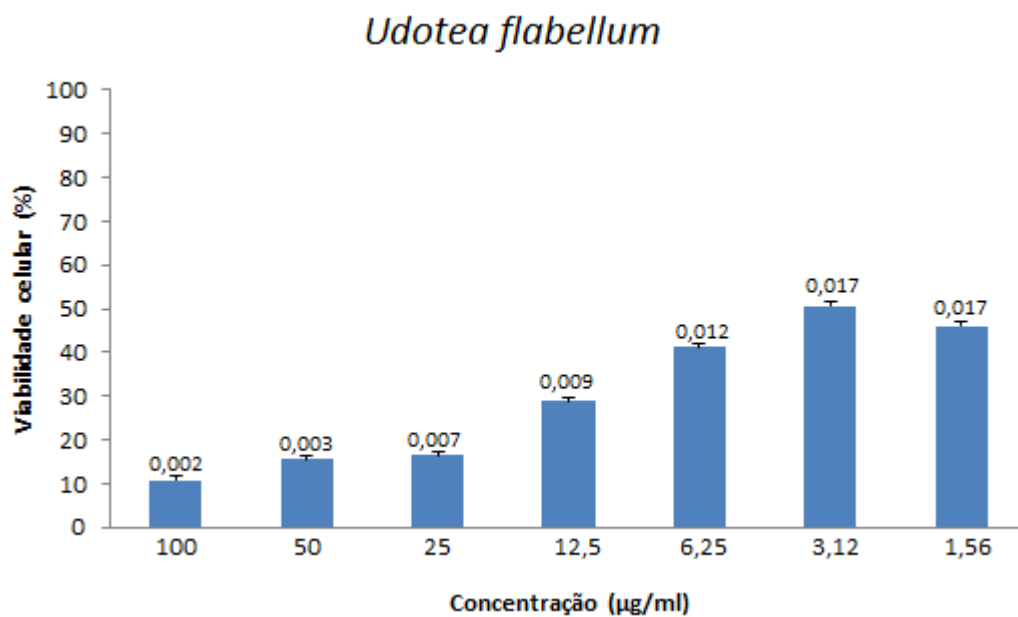


Figura 19. Gráfico de viabilidade celular (média±desvio padrão do percentual de crescimento celular) de células BGM com o extrato de *Udotea flabellum*.





**Tabela 4. Citotoxicidade e índice de seletividade em macrófagos e linhagem celular BGM após incubação com os extratos de *Gracilaria birdiae*, *Spatoglossum schroederi* e *Udotea flabellum*.**

Alga	DL <sub>50</sub> (*) Macrófagos	DL <sub>50</sub> (*) BGM	IS(**) Macrófagos	IS(**) BGM	Toxicidade dos extratos
<i>Gracilaria birdiae</i>	3,05	5,02	> 32,78	>19,92	Baixa
<i>Spatoglossum schroederi</i>	2,00	3,08	>23,95	> 15,55	Baixa
<i>Udotea flabellum</i>	3,37	6,80	> 29,67	> 14,70	Baixa

(\*) DL<sub>50</sub>: dose letal mínima que matou 50% das células

(\*\*) IS: índice de seletividade. Esse índice é calculado pela divisão da CI<sub>50</sub> pela DL<sub>50</sub> determinado do teste *in vitro* contra a cepa 3D7. Valores  $\geq 10$  indicam baixa ou nenhuma toxicidade; valores  $< 10$  indicam toxicidade dos extratos.

#### 5.4 Ensaio de toxicidade aguda *in vivo*

Durante a observação dos animais no período de 8 dias, nenhum dos animais dos grupos morreram. Com a dose testada (2000 mg/kg/animal), não foi verificada alterações na perda de peso corpóreo, frequência cardíaca, frequência respiratória e comportamento. Foi verificado no 7º e 8º dia de observação o eriçamento de pelos nos animais que receberam a dose do extrato etanólico de *Gracilaria birdiae*.

#### 5.5 Ensaio antimalárico *in vivo*

Os resultados obtidos demonstraram que os extratos brutos de *Spatoglossum schroederi* e *Udotea flabellum* só foram ativos na dose de 500 mg/kg/animal. Para o extrato etanólico de *S. schroederi* na dose de 500 mg/kg, foi observada a redução de parasitemia de

53,21% e 48,18%, respectivamente (primeiro experimento) no 5° e 7° dias, e 47,46% e 33,33% para o 5° e 7° dia, respectivamente, no segundo experimento realizado (tabela 5).

O extrato etanólico de *U. flabellum* na dose de 500 mg/kg apresentou relevante inibição de parasitemia no quinto e sétimo dia após a infecção, com o valor de 32,85% e 57,77% respectivamente (primeiro experimento realizado) e 43,88% e 58,41% para o 5° e 7° dia, nessa ordem, no segundo experimento realizado (tabela 5).

Os extratos etanólicos de *Gracilaria birdiae* nas doses de 1000 e 500 mg/kg e os extratos etanólicos de *Spatoglossum schroederi* e *Udotea flabellum* na dose de 1000 mg/kg foram inativos (tabela 5). Na realização do terceiro experimento, apenas o extrato da alga verde *Udotea flabellum* apresentou resultado significativo de 34,89% no 7° dia após a infecção (tabela 5).

A mortalidade cumulativa também é demonstrada em uma tabela, comparando a média da mortalidade em cada experimento realizado (tabela 6).

**Tabela 5. Supressão da parasitemia do *Plasmodium berghei* em animais infectados e média da sobrevivência dos animais após a realização dos três experimentos realizados (n=3). Tratamento oral (1000 e 500 mg) com os extratos etanólicos de *Gracilaria birdiae*, *Udotea flabellum* e *Spatoglossum schroederi*.**

Espécie/Antimalárico de referência	Dose do extrato etanólico (mg/kg/dia) <sup>a</sup>	% parasitemia ± D.P após infecção* (% inibição do crescimento do parasito)**					
		Experimento 1		Experimento 2		Experimento 3	
		5º dia	7º dia	5º dia	7º dia	5º dia	7º dia
<i>Gracilaria birdiae</i>	1000	3,73 ± 0,59 (0)	6,32 ± 0,14 (0)	16,51 ± 1,22 (0)	28,15 ± 2,63 (0)	8,05 ± 1,02 (0)	13,94 ± 1,87 (0)
	500	2,39 ± 0,20 (14,64%)	3,06 ± 0,03 (20,72%)	3,21 ± 0,03 (4,17%)	2,02 ± 0,67 (35,87%)	6,92 ± 1,06 (19,53%)	7,91 ± 0,79 (14,94%)
<i>Udotea flabellum</i>	1000	2,30 ± 0,63 (17,85%)	3,20 ± 0,79 (17,09%)	3,18 ± 1,71 (5,07%)	3,20 ± 1,28 (0)	6,75 ± 1,80 (21,51%)	7,84 ± 0,24 (15,69%)
	500	1,88 ± 0,51 (32,85%)	1,63 ± 0,08 (57,77%)	1,88 ± 0,26 (43,88%)	1,31 ± 0,08 (58,41%)	3,11 ± 1,74 (47,67%)	3,75 ± 0,08 (59,67%)
<i>Spatoglossum schroederi</i>	1000	3,87 ± 0,57 (0)	3,07 ± 0,12 (20,46%)	4,77 ± 4,64 (0)	4,72 ± 1,05 (0)	8,03 ± 0,93 (3,48%)	13,82 ± 0,70 (0)
	500	1,31 ± 0,54 (53,21%)	2,00 ± 0,02 (48,18%)	1,76 ± 0,53 (47,46%)	2,10 ± 0,07 (33,33%)	3,87 ± 0,10 (54,65%)	5,14 ± 0,47 (44,73%)
Cloroquina (CQ)	5	0,20 ± 0,04 (92,85%)	0,20 ± 0,07 (96,31%)	0,23 ± 0,09 (93,13%)	0,20 ± 0,04 (94,60%)	0,26 ± 0,01 (93,55%)	0,18 ± 0,02 (96,99%)

\* = média ± desvio padrão.

\*\* = redução da parasitemia em relação ao controle de camundongos não tratados.

<sup>a</sup> = dose dos extratos testados que reduziu a parasitemia em ≥ 30% são considerados ativos.

Cloroquina (CQ) foi administrada ao grupo controle positivo ( 5mg/kg/dia); redução de parasitemia entre (93-97%).

<sup>b</sup> = para o controle negativo foi administrado Tween-20 2%.

**Tabela 6. Média de sobrevivência dos animais ± D.P após a realização dos três experimentos (n=3 em cada experimento).**

Veículo/Extrato	Dose (mg/kg) 0 <sup>a</sup>	Média de sobrevivência (dias) ± D.P. tratamento via oral		
		Experimento 01	Experimento 02	Experimento 03
		22 ± 2,45	21 ± 2,82	22,33 ± 5,5
<i>Gracilaria birdiae</i>	1000	17,66 ± 1,67	18,66 ± 2,49	20 ± 3,26
	500	21 ± 1,14	20 ± 2,16	18,66 ± 1,24
<i>Udotea flabellum</i>	1000	21,66 ± 1,8	20,33 ± 2,8	23 ± 3,74
	500	20,33 ± 2,35	21,66 ± 2,62	19 ± 2,94
<i>Spatoglossum schroederi</i>	1000	20 ± 1,24	22,66 ± 1,24	20,33 ± 2,86
	500	22 ± 2,47	22,66 ± 0,47	22,33 ± 6,34

<sup>a</sup> controle negativo recebeu 0,2 ml de Tween-20 2%.

Controle positivo recebeu 5 mg/kg/dia de cloroquina; média de sobrevivência: 27,66 ± 2,31 (experimento 01) e 28,33 ± 1,24 dias (experimentos 02 e 03).

Após a realização dos 3 experimentos, cálculos com o erro-padrão foram efetuados, e assim obtidos os seguintes resultados de inibição de parasitemia, conforme mostrado nas tabelas 7 e 8. As figuras 20 e 21 referem-se aos resultados da inibição de parasitemia dos extratos que apresentaram atividade antimalárica igual ou superior a 30%, considerados como parcialmente ativos (CARVALHO et al., 1991).

**Tabela 7. Supressão *in vivo* da parasitemia (5° dia) do *P. berghei* após administração dos extratos etanólicos de *Gracilaria birdiae*, *Udotea flabellum* e *Spatoglossum schroederi*. Os valores apresentados são médias de três experimentos independentes  $\pm$  erro-padrão. Resultados de inibição maiores ou iguais a 30% são considerados ativos.**

Espécie/Extrato etanólico	Dose mg/kg/dia	Experimento 01	Experimento 02	Experimento 03	Supressão após cálculo do erro-padrão (*)
<i>Gracilaria birdiae</i>	1000 mg	-	-	-	-
	500 mg	14,64%	4,17%	19,53 %	-
<i>Udotea flabellum</i>	1000 mg	17,85 %	5,07%	21,51%	16,90%
	500 mg	32,85%	43,88%	47,67%	<b>44,60%</b>
<i>Spatoglossum schroederi</i>	1000 mg	-	-	3,48%	-
	500 mg	53,21 %	47,46 %	54,65%	<b>52,95%</b>

\*Média  $\pm$  D.P. das parasitemias após os três experimentos: Tween =  $3,07 \pm 0,27$ ; *Udotea flabellum* 1000 mg =  $4,74 \pm 2,16$ ; *Udotea flabellum* 500 mg =  $2,72 \pm 1,61$ ; *Spatoglossum schroederi* 500 mg =  $2,31 \pm 1,11$ ).

**Tabela 8. Supressão *in vivo* da parasitemia (7° dia) do *P. berghei* após administração dos extratos etanólicos de *Gracilaria birdiae*, *Udotea flabellum* e *Spatoglossum schroederi*. Os valores apresentados são médias de três experimentos independentes  $\pm$  erro-padrão. Resultados de inibição maiores ou iguais a 30% são considerados ativos.**

Espécie/Extrato etanólico	Dose mg/kg/dia	Experimento 01	Experimento 02	Experimento 03	Redução geral após cálculo do erro-padrão (*)
<i>Gracilaria birdiae</i>	1000 mg	-	-	-	-
	500 mg	20,72%	35,87%	14,94%	15,34%
<i>Udotea flabellum</i>	1000 mg	17,09%	-	15,69%	21,24%
	500 mg	57,77%	58,41%	59,67%	<b>54,67 %</b>
<i>Spatoglossum schroederi</i>	1000 mg	20,46%	-	-	-
	500 mg	48,18%	33,33%	44,73%	<b>37,39%</b>

\*Média  $\pm$  D.P. das parasitemias após os três experimentos: Tween (controle negativo) =  $4,92 \pm 1,06$ ; *Udotea flabellum* 500 mg =  $2,23 \pm 1,08$ ; *Spatoglossum schroederi* 500 mg =  $3,08 \pm 1,45$ .

Figura 20. Gráfico de redução de parasitemia do extrato etanólico de *Udotea flabellum* na dose 500 mg/kg administrada via oral após cálculo de erro-padrão dos 3 experimentos. A inibição de parasitemia foi calculada a partir da comparação com o grupo controle (animais não tratados).

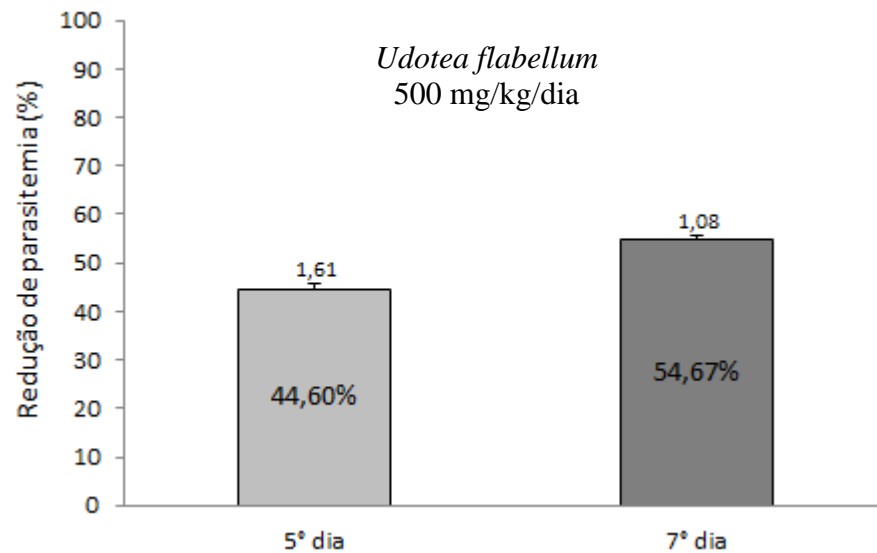
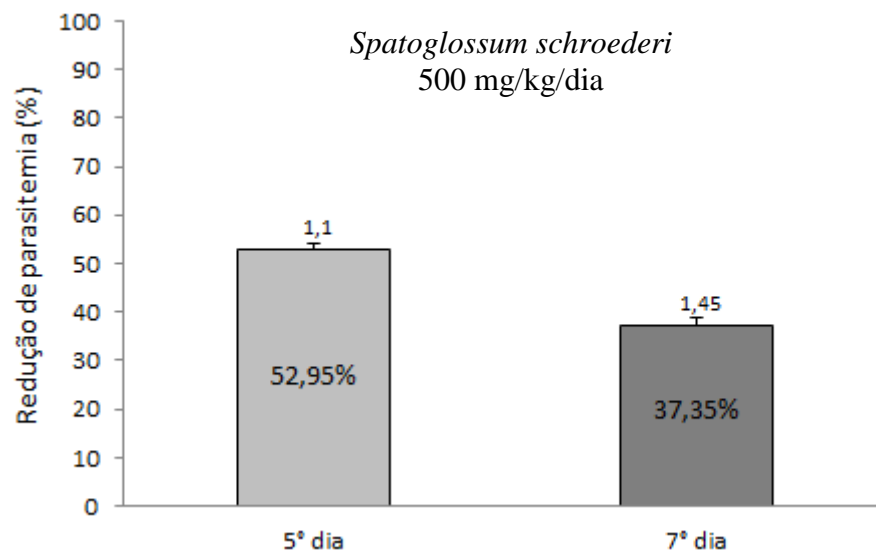


Figura 21. Gráfico de redução de parasitemia do extrato etanólico de *Spatoglossum schroederi* na dose 500 mg/kg administrada via oral após cálculo de erro-padrão dos 3 experimentos. A inibição de parasitemia foi calculada a partir da comparação com o grupo controle (animais não tratados).



## 6 DISCUSSÃO

O ambiente marinho é uma incomparável reserva de produtos naturais bioativos, muitos dos quais exibem características estruturais que não são encontrados em produtos naturais terrestres (IRELAND et al., 1988). A cada ano, um aumento no número de metabólitos marinhos é relatado na literatura, indicando que esse ambiente será uma fonte alternativa de produtos naturais durante muitos anos.

Algas marinhas são fontes vitais de substâncias bioativas usuais desde duas décadas (RAVIKUMAR et al., 2010). Vários estudos tem demonstrado que as algas possuem diversos componentes com significativas atividades biológicas, como antibacteriana (RAVIKUMAR et al., 2002, 2005, 2009; SURESHKUMAR et al., 2002; SHEHNAZ, 2003), antifúngica (RAO; SHELAT, 1982; VIDHYAVATHI; SHUDHAR, 1991; RAVIKUMAR et al., 2009), antiviral (PONCE et al., 2003; ZHU et al., 2003), anti-inflamatória (TAN et al., 2000; JOTHIBHAI et al., 2009), citotóxica (SHEHNAZ, 2003; MANILAL et al., 2009), nematicida (BAQAR NAQVI et al., 1992; MANILAL et al., 2009), larvicida (MANILAL et al., 2009), fitotóxica (SHEHNAZ, 2003), anticoagulante (ANAND et al., 2009) e atividade espermicida (PRAKASH, 2004).

A busca por algas no litoral do RN com componentes bioativos que apresentem possíveis atividades farmacológicas possui relevância não só para o desenvolvimento científico, mas também ecológico e econômico-financeiro. A alga possui um papel fundamental na manutenção da vida marinha, realizando a manutenção do equilíbrio biológico nos ambientes aquáticos, ocasionando a continuidade da fauna existente, podendo ser utilizada como fonte de alimento e matéria-prima. Além disso, desde muitos anos, a população litorânea do Nordeste brasileiro tem encontrado nas algas marinhas um complemento de renda familiar. Um dos locais de ocorrência da alga *Gracilaria* no Estado localiza-se na praia do Rio do Fogo/RN, e a obtenção dessas pode ser feita a partir de associações de catadores de algas da região, o que além de contribuir para a renda familiar, favorece também um potencial desenvolvimento da região. Contudo, apesar dos dados na literatura mostrarem o potencial farmacológico de algas quanto à atividade antimalárica; e do Rio Grande do Norte possuir uma relevante diversidade de algas presentes na região, os estudos com relação a essa abordagem com algas no Estado e no Brasil são incipientes.

A escolha da realização das extrações com o solvente lipofílico etanol baseou-se em características da polaridade do mesmo. O etanol possui a propriedade de extrair compostos

de baixa a média polaridade, por ser um solvente intermediário entre substâncias polares e apolares, o que permite a extração da maioria de substâncias possivelmente presentes nas algas estudadas. Devido ainda não serem conhecidos quais compostos (e quais as polaridades) presentes nos componentes bioativos dos extratos estudados, optou-se pela utilização do solvente com a polaridade intermediária.

Os resultados quanto à fitoquímica mostraram que o comportamento de extração do etanol para as três espécies estudadas, nas três extrações realizadas, indicam que o solvente lipofílico conseguiu extrair a maior parte das substâncias presentes nos extratos brutos já na primeira extração realizada, uma vez que as segundas e terceiras extrações realizadas demonstram um decaimento de massa de aproximadamente 50% (para as algas *Spatoglossum schroederi* e *Udotea flabellum*) e decaimento de 43% e 65% aproximadamente, para a segunda e terceira extração de *Gracilaria birdiae*. Deste modo, para as algas marrom e verde, o solvente lipofílico apresentou um comportamento esperado quanto à extração dos compostos presentes nas algas estudadas, sendo a primeira extração a responsável por exaurir uma maior quantidade de possíveis componentes bioativos das espécies *Spatoglossum schroederi* e *Udotea flabellum*. Já para a alga *Gracilaria birdiae*, o etanol não se apresentou como um solvente ideal para extração, pois foi visto que as massas obtidas foram maiores entre a segunda e terceira extração.

Estudos anteriores mostraram o comportamento de extração das algas com os solventes etanol e água (3:1), com o rendimento variando entre 0,66% para *C. toxifolia* e 2,12% para *C. torta* (RAVIKUMAR et al., 2010). Outros relatos em literatura mostraram que, para outras espécies do gênero *Gracilaria*, os rendimentos de extração obtidos a partir da utilização dos solventes etanol e água (3:1) consistiram em 2,58% (*G. verrucosa*) e 8,69% para *G. corticata* (RAVIKUMAR et al., 2011). Em nosso estudo foi utilizado apenas o solvente etanol, e o menor rendimento de extração foi visto para a *Gracilaria birdiae* (tabela 2). Esse fato pode ser explicado pela utilização apenas do solvente lipofílico, o que mostra que possivelmente os compostos presentes nessa espécie possuem característica polar, tendo afinidade com solventes mais próximos dessa faixa, como a água. Provavelmente o uso da água como solvente possibilitaria uma maior extração dos componentes existentes nessa alga em particular, o que resultaria em um maior rendimento de extração da mesma.

Estudos recentes mostram diversas atividades atribuídas a extratos e componentes isolados de algas marinhas de um dos gêneros investigados nesse trabalho. Os polissacarídeos isolados de *G. birdiae* mostraram atividade anti-inflamatória ao inibir a migração de leucócitos para a cavidade intraperitoneal (DE-SOUZA-OLIVEIRA-VANDERLEI, et al.,

2011). A atividade antioxidante de extratos etanólicos de *G. cornea* e *G. birdiae* foram descritas, com  $CI_{50}$ = 0,77 mg/ml e 0,76 mg/ml, respectivamente (SOUZA et al., 2011). A atividade antiprotozoária contra *Leishmania* também foi descrita para os extratos aquosos de *G. salicornia* e *corticata*, com  $CI_{50}$ = 74  $\mu$ g/ml e 105  $\mu$ g/ml, respectivamente (FOULADVAND et al., 2011).

Extratos orgânicos de algas do gênero *Udotea* também apresentaram atividade antiprotozoária contra *Trichomonas vaginalis*, com  $CI_{50}$ = 1,66  $\mu$ g/ml (MOO-PUC et al., 2008). Cantillo-Ciau et al., (2010), demonstraram que a alga parda *Lobophora variegata* possui atividade contra os protozoários *Entamoeba histolytica* e *Trichomonas vaginalis*.

A despeito de estudos relacionados com atividade antimalárica e algas marinhas, Orham et al., (2006) demonstraram 5 extratos etanólicos de algas das espécies *C. glomerata*, *D. dichotoma*, *S. furcellata*, *S. natans* e *U. lactuca* com atividade antiplasmódica. Em estudos recentes, foi visto que algumas espécies de algas vermelhas possuem componentes bioativos com potencial efeito antimalárico (LANE et al., 2009). Em outra investigação, estudos mostraram o potencial antimalárico de algas vermelhas, onde meroditerpenos (caloficolídeo A) isolados de *Callophycus serratus* e tocoferóis obtidos de *Amphiroa crassa* (b-tocoferilhidroquinona e d-tocoferilhidroquinona) apresentaram atividade contra *P. falciparum*, com  $CI_{50}$  de 5,2  $\mu$ M para o meroditerpeno e 220 e 10  $\mu$ M para os tocoferóis, respectivamente (STOUT et al., 2010).

Ainda, fucoidanas obtidos da alga marrom *Undaria pinnatifida* (frações denominadas F1, F2 e F3) apresentaram  $CI_{50}$  de 9,17; 7,28; e 1,95  $\mu$ g/ml, respectivamente contra a cepa 3D7 de *P. falciparum* e  $CI_{50}$  de 7,03; 4,74; e 2,21  $\mu$ g/ml, respectivamente contra a cepa K1 de *P. falciparum* (CHEN et al., 2009).

Estudos com extratos etanólicos das algas *Caulerpa toxifolia* e *Caulerpa peltata* demonstraram atividade *in vitro* contra o *Plasmodium falciparum*, com  $CI_{50}$  de 5,06 e 16,69  $\mu$ g/ml, respectivamente (RAVIKUMAR et al., 2011). Ainda, a alga *Gracilaria verrucosa* demonstrou atividade antimalárica com um  $CI_{50}$  de 5,55  $\mu$ g/ml (RAVIKUMAR et al., 2010).

Apesar de os valores encontrados da  $CI_{50}$  no nosso trabalho serem relativamente altos, os valores da  $DL_{50}$  dos extratos das algas testadas apresentaram baixa a moderada toxicidade celular no modelo *in vitro*; além disso, as algas *Spatoglossum schroederi* e *Udotea flabellum* apresentaram atividade antimalárica, sendo consideradas parcialmente ativas. No ensaio de toxicidade aguda *in vivo*, nenhum dos parâmetros de toxicidade (piloereção, alterações de peso, frequência cardíaca, frequência respiratória e comportamento) foram



vistos. Resultados *in vitro*, bem como o índice de seletividade e os testes *in vivo* demonstraram então a baixa toxicidade nesses extratos.

Drogas antimaláricas usuais apresentam toxicidade, como a quinina, um alcalóide isolado das cascas da árvore cinchona em 1820. A quinina continua a ser uma droga anti-malária importante quase 400 anos após a sua eficácia ter sido documentada (ACHAN et al., 2011). Seu uso contínuo é desafiado por sua baixa tolerabilidade, baixa adesão com regimes posológicos complexos, e a disponibilidade de drogas anti-malárias mais eficazes. A quinina é considerada como uma droga de janela terapêutica estreita, tendo o risco de uma série de efeitos colaterais como a hipoglicemia, agranulocitose, distúrbios hemorrágicos, efeitos cardiovasculares e outros que são particularmente relevantes para pacientes idosos (CRAMER et al., 2011).

Os efeitos adversos oriundos da utilização da quinina são substanciais. Os efeitos secundários comumente vistos em concentrações terapêuticas são referidos como cinchonismo, com formas leves incluindo zumbido, dor de cabeça uma ligeira perturbação da audição e náuseas. Manifestações mais graves incluem vertigem, vômitos, dor abdominal, diarreia, perda auditiva acentuada, e os sintomas visuais com perda inclusive de visão. Hipotensão pode ocorrer se a droga é administrada muito rapidamente, e trombose venosa pode ocorrer após injeções intravenosas. A hipoglicemia é um outro lado comum efeito da terapia de quinina e é um problema particular em mulheres grávidas. Menos freqüente, porém relatados, são os efeitos colaterais mais graves da terapia com quinina, que incluem erupções da pele, asma, trombocitopenia, lesões hepáticas e psicose. Porém, no futuro próximo, a quinina continuará a desempenhar um papel significativo papel no tratamento da malária, particularmente em ambientes de recursos limitados (ACHAN et al., 2011).

As algas possuem uma rica fonte de metabólitos secundários, como taninos, flavonóides, ácidos fenólicos, bromofenóis e carotenóides que podem exibir diferentes atividades biológicas. Espera-se que mecanismo de ação desses extratos possa estar associado a esses metabólitos secundários, que, quando presentes, agindo isoladamente ou em sinergismo podem se relacionar com a inibição do parasito; esse efeito pode ser possivelmente explicado pela inibição da invasão de merozoítos nos eritrócitos (ADAMS et al., 2005) ou rompimento das rosetas ocasionadas pelo *P. falciparum* (CARLSON et al., 1992; ROWE et al., 1994), bem como por outras vias ainda não elucidadas.

É importante ressaltar, que a maioria dos estudos de atividade antimalárica em algas, foram realizadas com compostos ativos isolados e/ou frações semi-purificadas. Além disso,

estamos descrevendo pela primeira vez, estudos de atividade biológica para essas três espécies de algas do litoral potiguar. Sabendo que nossa abordagem seguiu uma triagem inicial, as perspectivas para próximos estudos consistem na partição dos extratos brutos que obtiveram melhor atividade antimalárica, pois a partir de frações semi-purificadas, pode-se isolar componente(s) que, individualmente, possam apresentar baixa ou moderada toxicidade celular e valores mais baixos de concentração inibitória *in vitro* contra o *Plasmodium falciparum*.

Testes esquizonticidas utilizando como modelos parasitos de roedores (PETERS, 1965), em particular a espécie *Plasmodium berghei* Vincke and Lips, 1948 em camundongos *Swiss* tem sido o modelo mais amplamente utilizado para testes de atividade farmacológica, devido a características como: facilidade na execução e grande valor na triagem de compostos com atividade antimalárica. O teste supressivo de quatro dias (descrito por Peters, 1965) foi utilizado nesse trabalho para a avaliação dos compostos com atividade esquizonticida sanguíneo. Por se tratar de um teste simples, pode ser utilizado rotineiramente no laboratório, sendo baseado na redução da parasitemia dos animais tratados, após a administração da droga teste por quatro dias consecutivos. Os grupos controles são tratados com água/Tween 1-2% (controle) ou com cloroquina, como droga antimalárica de referência.

Contudo, em trabalho realizado por Ferreira-da-Cruz *et al.*, (2000) utilizando a cepa *Pasteur* do *P. berghei*, concluiu-se que essa não foi capaz de revelar atividade antimalárica, pois foi observada a variabilidade dos padrões de parasitemia observados nos camundongos suíços tratados com extratos hexânicos e etanólicos de espécies vegetais usada na região amazônica (CRUZ, 1985; CABRAL *et al.*, 1993).

No entanto, a variabilidade individual de parasitemia em camundongos não isogênicos (*outbred*) é mais próxima das observadas em seres humanos, como de fato, aconteceu em nosso estudo. A interação dos fatores genéticos e imunológicos do hospedeiro e do parasito em associação com determinada droga poderá resultar em uma eficácia mais ou menos expressiva (CORDEIRO *et al.*, 1983). Em nosso estudo, a população amostral constituiu-se de animais *Swiss (outbred)* e as variações individuais nos animais infectados podem ter constituído em mais um fator influente na atividade da droga, como acontece na população humana, consistindo assim um teste bem aceito para triagem de drogas antimaláricas.

No presente trabalho, a rota de administração de todos os extratos foi realizada pela via oral (*per gavage*), e assim, a distribuição e bioequivalência dos mesmos seguiram a metabolização através da passagem da droga pela mucosa gastrointestinal, posteriormente atravessando o endotélio das células da parede capilar, para, finalmente alcançar a corrente

sanguínea (ZANINI; OGA, 1979). A velocidade de desintegração e dissolução da droga, por essa via, provavelmente ocorre de maneira mais lenta, o que pode influenciar na quantidade da droga absorvida pelo organismo animal, refletindo na biodisponibilidade dos extratos.

Os extratos de *Spatoglossum schroederi* e *Udotea flabellum* na dose de 1000 mg/kg e *Gracilaria birdiae* nas duas doses testadas mostraram pouco ou nenhum efeito significativo *in vivo*, o que pode ser explicado pela variação na composição dos extratos (FERREIRA-DA-CRUZ et al., 2000) ou provavelmente por fatores farmacocinéticos presentes nos compostos presentes nos mesmos.

O extrato etanólico de *Udotea flabellum* na dose de 500 mg/kg apresentou significativa redução e parasitemia, sendo o melhor percentual de inibição observado no 7º dia (quando comparados a alga *Spatoglossum schroederi*, na mesma dose testada). Esses fatores provavelmente podem estar relacionados ao tempo gasto pela droga para atingir seu sítio de ação (tempo de latência da droga); de acordo com o observado, é provável que seja em torno de cinco a sete dias o tempo para a ação dos compostos ativos ou bioequivalência. Todavia, os fenômenos de latência e tempo de duração da atividade da droga também são alterados por variações individuais, podendo causar efeito imediato, simultâneo com o início de sua atividade farmacológica ou defasagem entre a ação e o efeito máximo (ZANINI; OGA, 1979).

O fato das doses de 500 mg/kg para o extrato etanólico de *Udotea flabellum* ter apresentado uma atividade antimalárica mais relevante apenas no 7º dia, sugere uma absorção lenta e um efeito retardado da droga, relacionado com a sua biodisponibilidade e a farmacocinética; o metabolismo de primeira passagem no fígado pode ser importante para esse efeito observado, e/ou ainda, as dissociações das ligações entre os componentes bioativos do extrato e as proteínas plasmáticas sanguíneas podem ocorrer de maneira mais lenta, o que funcionaria como um reservatório do fármaco para a circulação sistêmica. Outro fator a ser considerado é a provável necessidade de uma dose de ataque maior para que se obtenha uma concentração efetiva no plasma sanguíneo, como ocorre com a cloroquina (SILVA et al., 2011). Esse efeito retardado ocorre também com alguns antibióticos usados em associação para o tratamento da malária, como a doxiciclina contra o *P. falciparum* (PRADINES et al., 2000) em combinação com mefloquina, atovaquona, artesunato ou *artemether* (LOOAREESUWAN et al., 1994; 1996; NA-BANGCHANG et al., 1996).

O extrato etanólico de *Spatoglossum schroederi*, na dose de 500 mg/kg, apresentou significativa atividade antimalárica no 5º e 7º dias após infecção. Estudos de Chen e

colaboradores (2009) mostraram que frações obtidas de uma fucoidana – polissacarídeo sulfatado – extraídas da alga marrom *Undaria pinnatifida*, inibiu a parasitemia em 37%.

A mortalidade não foi significativamente reduzida pelo tratamento dos animais infectados com nenhuma das doses utilizadas, o que pode ser explicado pela meia-vida do extrato, com rápida degradação e metabolização no organismo ou ainda devido a variações imunológicas em cada animal utilizado nos estudos.

Considerando a presença de polissacarídeos, taninos, flavonóides, ácidos fenólicos e carotenóides; e considerando que compostos como açúcares, proteínas, fenóis e ácidos carboxílicos presentes em algumas algas, estão provavelmente relacionados com a atividade antimalárica das mesmas (RAVIKUMAR et al., 2010); tais metabólitos podem estar agindo de maneira isolada, sinergicamente e/ou competindo pelo mesmo sítio de ligação, o que poderia interferir na atividade esperada contra o *Plasmodium*. Os prováveis mecanismos de ação sugeridos para esses extratos podem estar relacionados com a inibição do desenvolvimento dos esquizontes nos eritrócitos, um incremento na resposta imune inata contra protozoários intracelulares (ZHU et al., 2012), ou ainda, outras vias não elucidadas.

A possibilidade dos extratos testados interferirem na resposta imunológica do hospedeiro é bastante plausível. Na malária, mecanismos da resposta imune inata (TRLs e NOD) são eficazes nas fases iniciais da infecção, possuindo influência decisiva no desenvolvimento de uma resposta adaptativa adequada e resultado final da doença (MALHOTRA et al., 2005). O IFN- $\gamma$ , citocina responsável pela mediação da resposta imune natural, possui papel decisivo na resolução da infecção primária, para limitar a replicação do parasito em fase precoce da infecção (MCCALL; SAUERWEIN, 2010).

Estudos realizados com polissacarídeos obtidos da planta chinesa *Achyranthes bidentata* mostraram que os mesmos aumentam a imunidade antimalárica em camundongos durante a infecção pelo *Plasmodium yoelii* 17XL (ZHU et al., 2012). Os resultados demonstraram que essa macromolécula pode ativar respostas imunes contra a infecção em estágios sanguíneos da malária murina. Assim, os componentes dos extratos etanólicos testados, bem como os polissacarídeos testados no estudo citado, podem estar associados ao aumento da imunidade natural do hospedeiro; este efeito pode ser mediado por estimulação da maturação e ativação das células dendríticas e macrófagos, os quais podem fagocitar eritrócitos parasitados e liberar citocinas pré-inflamatórias.

Desse modo, a presente pesquisa permitirá que sejam realizados testes de extratos, frações ou moléculas obtidas de algas presentes no litoral Norte-rio-grandense, o que pode contribuir para a formação de uma rede multidisciplinar e multiinstitucional de grande

alcance, cuja principal meta é encontrar espécies com atividade antimalárica *in vitro* e *in vivo*. A mais importante, entre as possíveis repercussões desse trabalho é a possibilidade de desenvolver novos medicamentos antimaláricos, visando o tratamento da malária resistente.

## 7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesse trabalho nos permitiram as seguintes conclusões:

1. Os extratos etanólicos das algas *Spatoglossum schroederi* e *Udotea flabellum* e apresentaram significativa atividade *in vitro* contra a cepa 3D7 do *Plasmodium falciparum*, sendo considerados parcialmente ativos; com a espécie *S. schroederi* a que melhor apresentou atividade antimalárica *in vitro*.
2. Os resultados *in vivo* mostraram que, apenas na dose de 500 mg/kg, os extratos de *Spatoglossum schroederi* e *Udotea flabellum*, apesar da variabilidade ocorrida, reduziram de modo significativo a parasitemia dos animais infectados;
3. Os extratos brutos das algas estudadas apresentaram uma citotoxicidade moderada a alta em macrófagos e células BGM; possuindo baixa toxicidade aguda em camundongos;
4. Apesar da significativa inibição da parasitemia *in vivo*, a percentagem de sobrevivência nos grupos dos animais tratados com os referidos extratos não apresentou diferenças estatísticas em relação ao grupo controle;
5. Por se tratar de um trabalho pioneiro de investigação de atividade antimalárica de algas marinhas na costa do Nordeste brasileiro, estudos fitoquímicos futuros serão realizados visando a otimização do efeito antimalárico nessa abordagem.

## 8 EXPECTATIVAS E PERSPECTIVAS DO ESTUDO

A partir dos resultados apresentados e discutidos, e ainda, baseado em estudos anteriores relacionados a algas marinhas e atividade antimalárica, nossos resultados prévios com os extratos brutos testados se mostram promissores e significativos. Os estudos recentes mostram a atividade antimalárica de alguns extratos de espécies de algas marinhas no modelo *in vitro*, e o nosso estudo, pela primeira vez, demonstra que os extratos das algas marinhas *Gracilaria birdiae*, *Spatoglossum schroederi* e *Udotea flabellum* possuem efeito no modelo *in vitro* contra o *Plasmodium falciparum* e as algas *Spatoglossum schroederi* e *Udotea flabellum* possuem relevante atividade *in vivo* contra o *Plasmodium berghei*.

Deve-se, como próxima etapa, realizar o fracionamento desses extratos, visando à identificação de possíveis componentes ativos que estejam agindo isolada ou sinergicamente com relação à atividade observada. Dados de estudos anteriores mostram que a alga parda *Spatoglossum schroederi*, uma das espécies estudadas nesse trabalho, possui, dentre outros componentes, polissacarídeos sulfatados – denominados fucoidanas (ROCHA *et al*, 2005) – e esses são relacionados com a atividade antimalárica em outras algas estudadas, como no estudo de Chen *et al* (2009). Espera-se que os resultados obtidos em estudos anteriores quanto à presença de fucoidanas e sua atividade biológica sejam observados também em nosso estudo, determinando a atividade antimalárica pela presença do mesmo ou ainda, ação sinérgica com demais componentes presentes no extrato bruto.

Nossas investigações também abordarão a presença desses componentes em nossos extratos, a partir de um futuro fracionamento dos mesmos, visando à busca de metabólitos secundários que apresentem atividade antimalárica.

Os resultados obtidos desse trabalho, a partir dos testes *in vivo*, servirão de parâmetro para novas e complementares abordagens. Experimentos futuros por outras vias de administração (subcutânea) serão realizados para a avaliação da biodisponibilidade e farmacocinética dos extratos estudados. Sabendo que um fator favorável a essa via é a biodisponibilidade da droga no organismo após injeção, espera-se que a velocidade de desintegração e dissolução da droga possa ocorrer de maneira mais rápida, o que influencia em uma maior quantidade da droga absorvida pelo organismo animal com manutenção dos níveis plasmáticos, possibilitando assim que as doses testadas *in vivo* que não apresentaram atividade antimalárica pela via oral possa gerar o efeito de inibição do parasito quando administradas pela via subcutânea.

## REFERÊNCIAS

- ACHAN, J.; TALISUNA, A. O.; ERHART, A.; YEKA, A.; TIBENDERANA, J. K.; BALIRAINÉ, F. N.; ROSENTHAL, P. J.; D'ALESSANDRO, U. Quinine, an old anti-malarial drug in a modern world: role in the treatment of malaria. **Malaria Journal**, v.10, p.144-156, 2011.
- ADAMS, Y. et al Carrageenans inhibit the in vitro growth of *Plasmodium falciparum* and cytoadhesion to CD36. **Parasitol Res.** [S.l.], v. 97, p. 290–294, 2005.
- ANAND, G. E. et al. Heparin like compound from green alga *Chaetomorpha antennina* as potential anticoagulant agent. **Asi J Med Sci.**[S.l.], v. 1, n.3, p. 114–116, 2009.
- ANDERSON, J. E. et al. A blind comparison of simple bench-top bioassay and human tumour cell cytotoxicities as antitumor prescreens. **Phytochem Anal.** [S.l.], v. 2, p. 107-111, 1991.
- BAQAR, N. S. et al. Nematicidal properties of selected marine algae from Karachi coast. **J Isla Aca Sci.** [S.l.], v. 5, n.3, p. 171–172, 1992.
- BARATA, R. C. Malária no Brasil: Panorama Epidemiológico na última década. **Caderno de Saúde Pública**, [S.l.], v. 11, p.128-136, 1995.
- BARNES, A. J. et al. Failure of chloroquine and proguanil prophylaxis in travelers to Kenya. **Lancet**, [S.l.], v. 338, p. 1338-1339, 1991.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Coordenação Geral no Programa Nacional de Controle da Malária **Malária no Brasil**. Sistema de Vigilância em Saúde, 2009.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de vigilância epidemiológica. **Guia de vigilância epidemiológica**. 7. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2009.
- BEN, R. F. et al,. Inhibitory effects of tunisian marine algal extracts on digestive lipases. **Appl Biochem Biotechnol.** [S.l.], v. 151, n.1, p.71-9, 2008.
- BEZERRA, A. F. **Cultivo de algas marinhas como desenvolvimento de comunidades costeiras**. 75 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2008.
- BUTCHER, G.A. et al. Inhibition of growth in vitro of *Plasmodium falciparum* by complex polysaccharides. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, [S.l.], v. 82, n.4, p. 558–559,1988.
- CAMARGO, E. P. Malária, maleita, paludismo. **Ciência e cultura**, [S.l.], v. 55, n.1, p. 26-30, 2003.
- CANTILLO-CIAU, Z. et al. The tropical brown alga *Lobophora variegata*: a source of antiprotozoal compounds. **Mar. Drugs**, [S.l.], v. 8, p. 1292-1304, 2010.



CARLSON, J. et al. Disruption of *Plasmodium falciparum* erythrocyte rosettes by standard heparin and heparin devoid of anticoagulant activity. **Am J Trop Med Hyg**, [S.l.], v. 46, p. 595–602, 1992.

CARVALHO, L. H.; KRETTLI, A.U. Antimalarial chemotherapy with natural products and chemically defined molecules. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, [S.l.], v. 86, p. 181-184, 1991. Suppl II.

CARVALHO, L.H. et al. Antimalarial activity of crude extracts from Brazilian plants. Studied *in vivo* in *P. berghei*-infected mice and *in vitro* against *P. falciparum* in culture. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, [S.l.], v. 24, p. 1113-1123, 1991.

CHAGAS, C. Notas sobre a epidemiologia do Amazonas. **Brasil Médico**, [S.l.], v. 27, n. 42, p.450-456, 1913.

CHANDEL, S.; BAGAI, U.; VASHISHAT, N. Antiplasmodial activity of *Xanthium strumarium* against *Plasmodium berghei*-infected BALB/c mice. **Parasitol Res**. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21847597>>. Acesso em: 24/05/2012.

CHEN, J. H. et al. Growth-inhibitory effect of a fucoidan from brown seaweed *Undaria pinnatifida* on *Plasmodium* parasites. **Parasitol Res**, [S.l.], v. 104, p. 245-250, 2009.

CLARK, D.L. et al. Saccharide anions as inhibitors of the malaria parasite. **Glycoconj J**, [S.l.], v. 14, n. 4, p. 473–479, 1997.

CONDON-RALL, M. E. Allied cooperation in malaria prevention and control: the World War II Southwest Pacific experience. **J Hist Med Allied Sci**, [S.l.], v. 46, n. 4, p. 493-513, oct. 1991.

CORDEIRO, R. S. et al. *Plasmodium berghei*: physiopathological changes during infections in mice. **Ann Trop Med Parasitol**, [S.l.], v. 77, n. 5, p. 455-465, oct. 1983.

COURA, J. R.; SUÁREZ-MUTIS, M.; LADEIA-ANDRADE, S. A new challenge for malaria control in Brazil: asymptomatic *Plasmodium* infection - a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [S.l.], v.101, n. 3, p. 229-237, 2006.

CRAMER, J. P.; LÓPEZ-VÉLEZ, R.; GERD D BURCHARD, G.D.; GROBUSCH, M. P.; DE VRIES, P. J. Treatment of imported severe malaria with artesunate instead of quinine - more evidence needed? **Malaria Journal**, v. 10, p. 256-258, 2011.

CUMASHI, A. et al. A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoidanas from brown seaweeds. **Glycobiology**, [S.l.], v. 17, n. 5, p. 541-5, 2007.

DEANE, L. A malária no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, [S.l.], v.1, n. 1, p. 71-111, 1985.

DE SOUSA, O.V.E. et al., The involvement of the HO-1 pathway in the anti-inflammatory action of a sulfated polisaccharide isolated from the red seaweed *Gracilaria birdiae*. **Inflamm Res**, 60, v.12, p. 1121-1130, 2011.

EGAN, T.J.; KASCHULA, C.H. Strategies to reverse drug resistance in malaria. **Curr. Opin. Infect. Dis.** [S.l.], v. 20, n. 11, p. 598–604, 2009.

FATTORUSSO, E.; SCAFATI, O.T. Marine antimalarials. **Mar. Drugs**, [S.l.], v. 7, p. 130-152, 2009.

FERREIRA-DA CRUZ, M. F. et al. The Intraperitoneal *Plasmodium berghei*-Pasteur Infection of Swiss Mice Is Not a System That Is Able to Detect the Antiplasmodial Activity in the *Pothomorphe* Plant Extracts That Are Used as Antimalarials in Brazilian Endemic Areas. **Experimental Parasitology**, [S.l.], v. 94, p. 243–247, 2000.

FINDLAY, J. A.; PATIL, S. D. Antibacterial constituents of the diatom *Navicula delognei*. **J Nat Prod**, [S.l.], v. 47, p.815-818, 1994.

FOULADVAND, M. et al. Evaluation of in vitro anti-Leishmanial activity of some brown, green and red algae from the Persian Gulf. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, [S.l.], v. 15, n. 6, p. 597-600, 2011.

GADELHA, P. E. **História de doenças:** ponto de encontros e de dispersões. Tese (Doutoradoem Saúde Pública) - Escola Nacional de Saúde Pública/Fiocruz, Rio de Janeiro, 1995.

GAY, F. et al. Mefloquine failure in child contracting falciparum-malaria in West África. **Lancet**, [S.l.], v.35, p. 120-121, 1990.

GOODMAN & GILMAN: **As bases farmacológicas da terapêutica**. 11. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill interamericana do Brasil, 2006.

GREENWOOD, B. M.; TARGETT, G.A.T. Malaria vaccines and the new malaria agenda. **Clin Microbiol Infect**, [S.l.], n. 17, p. 1600-1607, 2011.

GUANTAI, E.; CHIBALI, K. How can natural product serve as a viable source of lead compound for the development of new/novel antimalarials? Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> Acesso em 24/05/2012.

HANDEL, T. M.; HORUK, R. Duffy antigen inhibitors: useful therapeutics for malaria? **Trends Parasitol.**, v.26, n.7, p.329-333, 2010.

HEGGE, S. Multistep adhesion of *Plasmodium* sporozoites. **Faseb J.**, v.24, n.7, p. 2222-2234, 2010.

HOCHMAN, G.; MELLO, M.T.B.; SANTOS, P.E.R. A malária em foto: imagens de campanhas e ações no Brasil da primeira metade do século XX. **História, Ciências, Saúde Manguinhos**, Rio de Janeiro, v. 9, p. 233-73, 2002.

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS. **Busca por táxons da flora brasileira.** USP. Disponível em: <<http://www.ib.usp.br/algaemaris/busca3.php?id=669>>. Acesso em 02 out. 2011.

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS. **Busca por táxons da costa brasileira – *Udotea flabellum*.** Disponível em: <<http://www.ib.usp.br/algaemaris/busca3.php?id=669>>. Acesso em : 03 out. 2011.

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS. Flora marinha do litoral norte do Estado de São Paulo e regiões circunvizinhas. **Boletim 294 da Faculdade de Ciências e Letras da USP - Botânica 21.** Disponível em: <<http://www.ib.usp.br/algaemaris/busca3.php?id=630>>. Acesso em 15 jun. 2010.

IRELAND, C.M. et al. Uniqueness of the marine environment: categories of marine natural products from invertebrates. In: \_\_\_\_\_. **biomedical importance of marine organisms.** California Academy of Science, California, United States of America, p 41–47, 1988.

IWAI, K. Antidiabetic and antioxidant effects of polyphenols in brown alga *Ecklonia stolonifera* in genetically diabetic KK-A(y) mice. **Plant Foods Hum Nutr.** [S.l.], v. 63, n. 4, p. 163-9, 2008.

JOTHUBAI, M. R.; KUMARESAN, S.; RAVIKUMAR, S. A preliminary study on the anti-inflammatory activity of methanol extract of *Ulva lactuca* in rat. **J Environ Biol**, v. 30, n.5, p. 899–902, 2009.

KANG, H. S. et al. Inhibitory phlorotannins from the edible brown alga *Ecklonia stolonifera* on total reactive oxygen species (ROS) generation. **Arch Pharm Res**, [S.l.], v. 27, n. 2, p. 194-8, 2004.

KHAN, M. N. et al. Anti-inflammatory activities of methanol extracts from various seaweed species. **J Environ Biol.** [ S.l.], v. 29, n. 4, p. 465-9, 2008.

KIM, J. Y. et al. Methanolic extracts of *Plocamium telfairiae* induce cytotoxicity and caspase-dependent apoptosis in HT-29 human colon carcinoma cells. **J Med Food**, [S.l.], v. 10, n. 4, p. 587-93, 2007.

KONIG, G. M.; WRIGHT, A. D. Marine natural products research: current directions and future potential. **Planta Med**, [S.l.], v. 62, p. 193-211, 1996.

KOTRBACEK, V. et al. Increased immune response in broilers after administration of natural food supplements. **Vet Med Praha**, [S.l.], v. 39, p. 321-328, 1994.

KRETTLI, A. U. A pesquisa da malária no Brasil. **Boletim da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência**, [ S.l.], p. 391-394, 1998.

LANE, A. L. et al. Antimalarial Bromophycolides J-Q from the Fijan red alga *Callophycus serratus*. **J. Org. Chem.**, [S.l.], v. 74, p. 2736-2742, 2009.

LOOAREESUWAN, S. et al. Randomized trial of mefloquine-doxycycline, and artesunate-doxycycline for treatment of acute uncomplicated falciparum malaria. **Am. J. Trop. Med. Hyg**, [S.l.], v. 50, p. 784-789, 1994.

- MALHOTRA, I. et al. Distinct Th1-and Th2-Type prenatal cytokine responses to *Plasmodium falciparum* erythrocyte invasion ligands. **Infect Immun**, [S.l.], v. 73, p. 3462-3470, 2005.
- MANILAL, A. et al. Biopotentials of seaweeds collected from southwest coast of India. **J Mar Sci Technol**, [S.l.], v. 17, n.1, p. 67-73, 2003.
- MARINHO-SORIANO, E.; CARNEIRO, M.A. DO A.; SORIANO, J-P. **Manual de identificação das macroalgas marinhas do litoral do Rio Grande do Norte**. [S.l.]: EDUFRN, 2009.
- MCCALL, M. B.; SAUERWEIN, R. W. Interferon-gamma—central mediator of protective immune responses against the pre-erythrocytic and blood stage of malaria. **J Leukoc Biol**, [S.l.], v. 88, p. 1131-1143, 2010.
- MCKENZIE, F. E.; BOSSERT, W. H. The Dynamics of *Plasmodium falciparum* Blood-stage Infection. **J. theor. Biol.**, [S.l.], v. 188, p. 127-140, 1997.
- MEYER, B. N. et al. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Med**, [S.l.], v. 45, p. 34-37, 1982.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portal da saúde. **Programa Nacional de Prevenção e Controle da Malária (PNCM) - 2003**. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar\\_texto.cfm?idtxt=21400](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=21400)>. Acesso em: 04. out. 2011.
- MONGELLI, E. et al. Screening of Argentine medicinal plants using the brine shrimp microwell cytotoxicity assay. **Int J Pharmacog**, [S.l.], v. 34, p. 249-254, 1996.
- MOO-PUC, R.; ROBLEDO, D.; FREILE-PELEGRIN, Y. Evaluation of selected tropical seaweeds for in vitro anti-trichomonal activity. **J Ethnopharmacol**, [S.l.], v. 120, n. 1, p. 92-7, 2008.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Immunol Methods**. [S.l.], v. 16, n. 1-2, p.55-63 dez. 1983.
- MOTA, M. L. **Atividade antimalárica de plantas medicinais da Biorregião do Araripe-CE em modelo murino - *Plasmodium berghei***. 147 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2009.
- MOTA, M. M; RODRIGUEZ, A. Invasion of mammalian host cells by *Plasmodium* sporozoites. **BioEssays**, [S.l.], v. 24, p. 149-156, 2002.
- MURRAY, C. J, et al. Global malaria mortality between 1980 and 2010: a systematic analysis. **Lancet**, [S.l.], v. 379, n.9814, p. 413-431, 4 fev. 2012.

NA-BANGCHANG, K. et al. Activity of arthemeter-azithromycin versus arthemeter-doxycycline in the treatment of multiple drug resistant falciparum malaria. **Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health**, [S.l.], v. 27, p.522-525, 1996.

NGASSAPA O. D. et al. New cytotoxic lupane lactones from *Kokoona ochracea*. **J Nat Prod**, [S.l.], v. 54, n. 5, p. 1353-1359, set./out. 1991.

NISBET, L. J.; MOORE, M. Will natural products remain an important source of drug research for the future? **Curr Opin Biotechnol**, [S.l.], v. 9, n. 6, p. 708-712, 1997.

OKOKON, J. E.; NWAFOR, P. A. Antiplasmodial activity of root extract and fractions of *Croton zambesicus*. **J Ethnopharmacol**, v. 121, n.1, p. 74-78, 2008.

ORHAN, I. et al. Turkish freshwater and marine macrophyte extracts show in vitro antiprotozoal activity and inhibit FabI, a key enzyme of *Plasmodium falciparum* fatty acid biosynthesis. **Phytomedicine**, [S.l.], v. 13, p. 388-393, 2006.

PANCAKE, S. et al. Malaria sporozoites and circumsporozoite proteins bind specifically to sulfated glycoconjugates. **J Cell Biol**, [S.l.], v. 117, n. 6, p. 1351-1357, 1992.

PARRA, A. L. et al. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. **Phytomedicine**, [S.l.], v. 8, p. 395-400, 2001.

PETERS, W. Drug resistance in *Plasmodium berghei* Vincke and Lips, 1948. I. Chloroquine resistance. **Exp Parasitol.**, [S.l.], v. 17, n. 1, p. 80-89, ago. 1965.

PETERSEN, I.; EASTMAN, R.; LANZER, M. Drug-resistant malaria: molecular mechanisms and implications for public health. **Febs Lett**, v.585, n.11, p. 1551-1562, 2011.

PHILLIPSON, J. D.; O'NEILL, M. J. Novel antimalarial drugs from plants? **Parasitol Today**. [S.l.], v. 2, n. 12, p. 355-359, dez. 1986.

PHILLIPSON, J. D. The case for 'plant medicines'. **Parasitol Today**. [S.l.], n. 12, p. 327-328, 1986.

PETERS, W. The problem of drug resistance in malaria. **Parasitology**, [S.l.], v. 90, n. 4, p. 705-15, 1985.

PHILLIPSON, J. D. Radioligand-receptor binding assays in the search for bioactive principles from plants. **J Pharm Pharmacol**, [S.l.], v. 51, n. 5, p. 493-503, maio 1999.

PINTO, E. P. **Rondônia, evolução histórica: criação do território federal do Guaporé, fator de integração nacional**. Rio de Janeiro: Expressão e Cultura, 1993.

PLASTINO, E.M.; OLIVEIRA, E.C. *G.birdiae*, (Gracilariales, Rhodophyta), a new species from the tropical South American with a terete frond and deep spermatangial conceptacles. **Phycologia**, [S.l.], v. 41, n. 4, p. 389-396, 2002.

PONCE, N. M. A. et al. Fucoïdanas from the brown seaweed *Adenocystis utricularis*: extraction methods, antiviral activity and structural studies. **Carbohydr Res**, [S.l.], v. 338, p. 153–165, 2003.

PRADINES, B. et al. Antibiotics for prophylaxis of *Plasmodium falciparum* infections: *in vitro* activity of doxycycline against Senegalese isolates. **Am. J. Trop. Med. Hyg**, [S.l.], v. 62, n. 1, p. 82-85, 2000.

PRAKASH, S. **In vitro studies on male antifertility compounds from seaweed marine halophytes**. Dissertação de mestrado, Universidade Manonmaniam sundaranar, Índia, 2004.

QUIGNARD, E.L.J. et al. Screening of plants found in Amazonas State for lethality towards brine shrimp. **Acta Amazonica**, [S.l.], v. 33, p. 93-104, 2003.

RAVIKUMAR, S. et al. Screening of seaweed extracts against antibiotic resistant post-operative infectious pathogens. **Seaweed Res Util Assoc**, [S.l.], v. 24, n.1, p. 95–99, 2002.

RAVIKUMAR, S. et al. Antibacterial activity of traditional therapeutic coastal medicinal plants against some pathogens. **J Environ Biol**, [S.l.], v. 26, p. 383–386, 2005.

RAVIKUMAR, S. et al. Antimicrobial compounds from marine halophytes for silkworm disease treatment. **Int J Med Med Sci**, [S.l.], v. 1, n. 5, p. 184–191, 2009.

RAVIKUMAR, S. et al. *In vitro* antiplasmodial activity of ethanolic extracts of seaweed macroalgae against *Plasmodium falciparum*. **Parasitol Res**: DOI 10.1007/s00436-010-2185-3, 2010.

RAVIKUMAR, S.; INBANESON, S.J.; SUGANTHI. Seaweed as a source of lead compounds for the development of new antiplasmodial drugs from South East coast of India. **Parasitol Res**: DOI 10.1007/s00436-010-2219-x, 2010.

RAO, P. S.; SHELAT, Y. A. Antifungal activity of different fractions of extracts from seaweeds. In: HOPPE, H. A.; LEVRING, T.; TANAKA, X. **Marine algae in pharmaceutical sciences**. Berlin: Walter de Gruyter, p. 93–98, 1982.

RINGWALD, P. et al. Failure of anti-malarial prophylaxis with mefloquine in África. **Trans R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, [S.l.], v. 84, p.348-349, 1990.

ROCHA, H.A. et al. Fucan inhibits Chinese hamster ovary cell (CHO) adhesion to fibronectin by binding to the extracellular matrix. **Planta Med.** [S.l.], v. 71, n. 7, p. 628-33, 2005.

RODRIGUES, R. A. F. et al. Otimização do processo de extração e isolamento antimalárico artemisinina a partir de *Artemisia annua* L. **Quim. Nova**, [S.l.], v. 29, n. 2, p. 368-372, 2006.

ROWE, A. et al. *Plasmodium falciparum*: a family of sulphated glycoconjugates disrupts erythrocyte rosettes. **Exp Parasitol**, [S.l.], v. 79, p. 506–516, 1994.

SACHS, J.; MALANEY, P. The economic and social burden of malaria. **Nature**, [S.l.], v. 415, p. 680–685, 2002.

SHEHNAZ, L. **Comparative phycochemical in investigations on a variety of marine algae from Karachi coast.** Dissertação de pós-doutorado, Paquistão, 2003.

SIDDQUI, S. et al. Antibacterial activity and fatty acid composition of the extract from *Hypnea musciformis* (Gigartinales, Rhodophyta). **Pak J Pharm Sci.**, [S.l.], v. 6, n. 1, p. 45-51, 1993.

SILVA, L. F. R. et al. *In vivo and in vitro* antimalarial activity of 4-Nerolidylcatechol. **Phytother. Res.**, [S.l.], v. 25, n. 8, p. 81–1188, 2011.

SOUZA, B.W. et al. Antioxidant potential of two red seaweeds from the Brazilian coasts. **J Agric Food Chem.** [S.l.], v. 59, n. 10, p. 5589-94, 2011.

STOUT, E.P. et al. Unusual antimalarial meroditerpenes from tropical red macroalgae. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [S.l.], v. 20, p. 5662–5665, 2010.

SURESHKUMAR, S.; JOHN, J. A.C; RAVIKUMAR, S. Antimicrobial activity of acetone extracts of seaweeds against human pathogens. **Seaweed Res Utiln**, [S.l.], v. 24, p. 111–115, 2002.

TAN, L.T. et al. Cis, cis- and trans, trans-ceratospongamide, new bioactive cyclic heptapeptides from the Indonesian red alga *Ceratodictyon spongiosum* and symbiotic sponge *Sigmatocia symbiotica*. **J Org Chem**, [S.l.], v. 28, p. 419–425, 2000.

TRAGER, W.; JENSEN, J. B. Human malaria parasites in continuous culture, 1976. **J Parasitol.** [S.l.], v. 91, n. 3, p. 484-486, jun. 2005.

TRAPE J. F. et al. Impact of chloroquine resistance on malaria mortality. **C. R. Acad. Sci.**, [S.l.], v. 3, n. 321, p. 689-697, 1998.

VAN HENS BROEK, M.B. et al. A trial of artemether or quinine in children with cerebral malaria. **N Engl J Med**, [S.l.], v. 335, n. 2, p. 69-75, jul. 1996 .

VIDHYAVATHI, N.; SRIDHAR, K. R. Seasonal and geographical variations in the antimicrobial activity of seaweeds from the Mangalore coast in India. **Bot Mar**, [S.l.], v. 34, p. 279–284, 1991.

VIGILÂNCIA EM SAÚDE: **A malária no Brasil.** [S.l.], 2005. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/be\\_malaria\\_01\\_2005.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/be_malaria_01_2005.pdf)>. Acesso em: 03 out. 2011.

WERNSDORFER, W. H. The development and spread of drug resistant malaria. **Parasitol Today**, [S.l.], v. 7, p. 297-303, 1991.

WITVROUW, M.; DE CLERCQ, E. Sulfated polysaccharides extracted from sea algae as potential antiviral drugs. **Gen Pharmacol**, [S.l.], v. 29, n. 4, p. 497-511, 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Malaria Report 2008.**

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Malaria Report 2010.**

XIAO, L.; YANG, C. et al. Sulfated polyanions inhibit invasion of erythrocytes by plasmodial merozoites and cytoadherence of endothelial cells to parasitized erythrocytes. **Infect Immun**, [S.l.], v. 64, n. 4, p.1373–1378, 1996.

YUNES, R. A.; PEDROS, R. C.; VIANA FILHO, C. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Quim. Nova**, [S.l.], v. 24, n. 1, p. 147-152, 2001.

ZANINI, A. C.; OGA, S. **Farmacologia aplicada.** São Paulo. Editora Atheneu, 1979.

ZHU, X. et al. Saccharides from the Chinese medicinal herb *Achyranthes bidentata* enhance anti-malarial immunity during *Plasmodium yoelii* 17XL infection in mice. **Malar J**, [S.l.], v. 11, n. 1, p. 49, 20 fev. 2012 .

ZHU, W. et al. Inhibitory effect of extracts of marine algae from Hong Kong against herpes simplexviruses. **Proceedings of the 17th international seaweed symposium.** Oxford: Oxford University Press, 2003. p 159–164.