



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
CURSO DE BIOMEDICINA

SARAH REJANE DANTAS BATISTA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMALÁRICA *IN VITRO* DE
EXTRATOS VEGETAIS OBTIDOS DE *SOLANUM PSEUDOQUINA***

NATAL
DEZ-2017

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMALÁRICA *IN VITRO* DE EXTRATOS VEGETAIS
OBTIDOS DE *SOLANUM PSEUDOQUINA*

por

SARAH REJANE DANTAS BATISTA

Monografia apresentada à Coordenação
do Curso de Biomedicina da Universidade
Federal do Rio Grande do Norte como
requisito parcial à obtenção do título de
Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr. Válter Ferreira de Andrade Neto

NATAL
DEZ-2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
CURSO DE BIOMEDICINA

A monografia avaliação da atividade antimalárica *in vitro* de extratos vegetais obtidos de *Solanum pseudoquina*

elaborada por Sarah Rejane Dantas Batista

e aprovada por todos os membros da Banca examinadora foi aceita pelo Curso de Biomedicina e homologada pelos membros da banca, como requisito parcial à obtenção do título de

BACHAREL EM BIOMEDICINA

Natal, _____ de _____ de 2017.

BANCA EXAMINADORA

Orientador Prof. Dr. Válter Ferreira de Andrade Neto
Departamento de Microbiologia e Parasitologia – DMP.

Prof. Dr. Marcelo de Sousa Silva
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas

Prof. Dr^a. Valeska Santana de Sena Pereira
Prof. Dra. da Faculdade Uninassau

Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN
Sistema de Bibliotecas - SISBI
Catalogação de Publicação na Fonte. UFRN - Biblioteca Setorial Prof. Leopoldo Nelson --Centro de Biociências - CB

Batista, Sarah Rejane Dantas.

Avaliação da atividade antimalárica in vitro de extratos vegetais obtidos de Solanum pseudoquina / Sarah Rejane Dantas Batista. - Natal, 2017.
26 f.: il.

Monografia (Graduação) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Biociências. Curso de Biomedicina.
Orientador: Prof. Dr. Valter Ferreira de Andrade Neto.

1. Malária - Monografia. 2. Atividade antimalárica - Monografia. 3. Extratos vegetais - Monografia. 4. Solanum pseudoquina - Monografia. I. Andrade Neto, Valter Ferreira de. II. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. III. Título.

RN/UF/BSE-CB

CDU 616.936

RESUMO

A malária é uma das principais doenças infecciosas do mundo. O número de casos vem crescendo devido ao diagnóstico tardio e ao aumento da resistência aos antimaláricos. Em 2015, foram 214 milhões de casos e 418 mil mortes por malária. A doença é caracterizada por ciclos de febre, calafrios e dores de cabeça, podendo afetar rins, fígado e o sistema nervoso, podendo levar até a morte. A malária deve ser prontamente reconhecida e tratada com o intuito de prevenir o agravamento da doença. Deve-se suspeitar da doença sempre que o paciente possuir histórico de viagens para áreas endêmicas e apresentar os sintomas clínicos. Entretanto, para o diagnóstico definitivo é necessário testes laboratoriais que devem detectar a presença do parasita ou de seus metabólitos. Em consequência do aumento da resistência, a eficácia dos fármacos de ação antimalárica atualmente disponíveis está sendo limitada, e recentes evidências sugerem que os parasitas também estão se tornando resistentes aos mais novos agentes. A resistência já foi documentada para quase todos os medicamentos disponíveis e, para muitas dessas drogas, os mecanismos de resistência são desconhecidos. Assim sendo, a pesquisa de substâncias extraídas de plantas medicinais pode ser promissora para a descoberta de compostos eficientes para o controle da malária. Este trabalho avaliou a atividade antimalárica de extratos vegetais obtidos de *Solanum pseudoquina* contra o *Plasmodium falciparum* (cepa 3D7) *in vitro*, contribuindo assim com possíveis ações terapêuticas alternativas e/ou complementares à terapêutica tradicional. A atividade antimalária foi avaliada a partir de testes da cultura com diferentes concentrações de seis extratos etanólicos de *Solanum pseudoquina* e a toxicidade foi avaliada em teste de hemólise. Os resultados demonstraram que todos seis extratos possuem atividade antimalárica, porém dois deles se mostraram tóxicos no teste de hemólise. Conclui-se que os extratos etanólicos de *Solanum pseudoquina* apresentaram atividade antimalárica *in vitro* contra o *Plasmodium falciparum*, sendo os extratos SPLE e SPBB os mais promissores. Entretanto, pesquisas futuras devem ser realizadas com o propósito de otimizar o efeito malárico desses extratos.

Palavras-chave: Malária. *Plasmodium falciparum*. Atividade antimalárica. Extratos vegetais. *Solanum pseudoquina*.

ABSTRACT

Malaria is one of the world's leading infectious diseases. The number of cases has been increasing due to late diagnosis and increased antimalarial resistance. In 2015, there were 214 million cases and 418 thousand malaria deaths. The disease is characterized by cycles of fever, chills and headaches, which can affect the kidneys, liver and nervous system, leading to death. Malaria should be promptly recognized and treated in order to prevent disease worsening. The disease should be suspected whenever the patient has a history of travel to endemic areas and presents clinical symptoms. However, for the definitive diagnosis it is necessary laboratory tests that must detect the presence of the parasite or its metabolites. As a result of increased resistance, the efficacy of currently available antimalarial drugs is being limited, and recent evidence suggests that parasites are also becoming resistant to the newer agents. Resistance has already been documented for almost all medications available, and for many of these drugs, resistance mechanisms are unknown. Thus, the search for substances extracted from medicinal plants may be promising for the discovery of efficient compounds for the control of malaria. This work evaluated the antimalarial activity of plant extracts obtained from *Solanum pseudoquina* against *Plasmodium falciparum* (strain 3D7) *in vitro*, thus contributing to possible alternative therapeutic actions and / or complementary to traditional therapeutics. The antimalarial activity was evaluated from the culture tests with different concentrations of six ethanol extracts of *Solanum pseudoquina* and the toxicity was evaluated in hemolysis test. The results showed that all six extracts had antimalarial activity, but two of them showed to be toxic in the hemolysis test. It is concluded that the ethanol extracts of *Solanum pseudoquina* presented antimalarial activity *in vitro* against the *Plasmodium falciparum*, being the extracts SPLE and SPBB the most promising. However, future research should be carried out with the purpose of optimizing the malarious effect of these extracts.

Keywords: Malaria. *Plasmodium falciparum*. Antimalarial activity. Plant extracts. *Solanum pseudoquina*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo de vida do <i>Plasmodium falciparum</i>	11
Figura 2: Antimaláricos atualmente disponíveis.....	14
Figura 3: <i>Solanum pseudoquina</i>	16
Figura 4: Extratos de <i>Solanum pseudoquina</i>	17
Figura 5 Fluxograma da obtenção de SPBN, SPBA e SPBB.....	18
Figura 6 Atividade <i>in vitro</i> dos extratos contra o <i>Plasmodium falciparum</i> (3D7) – Redução da Parasitemia.....	20
Figura 7: Efeito dos extratos na parasitemia.....	20
Figura 8: Teste de hemólise.....	21
Figura 9: Perfil de sobrevivência de <i>P. falciparum</i> após incubação por 48 h de extratos etanólicos de <i>Solanum pseudoquina</i>	22

LISTA DE ABREVIATURAS SÍMBOLOS

G6PD	Glicose-6-fosfato-desidrogenase
OMS	Organização Mundial da Saúde
ACT	<i>Artemisinin-based Combination Therapy</i>
O ₂	Gás Oxigênio
CO ₂	Gás carbônico
N ₂	Gás Nitrogênio
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SPLE	Extrato etanólico das folhas de <i>Solanum pseudoquina</i>
SPBA	Fração do extrato etanólico das cascas dos caules de <i>Solanum pseudoquina</i>
SPBN	Fração do extrato etanólico das cascas dos caules de <i>Solanum pseudoquina</i>
SPRE	Extrato etanólico das cascas das raízes de <i>Solanum pseudoquina</i>
SPBE	Extrato etanólico das cascas dos caules de <i>Solanum pseudoquina</i> Fração do extrato etanólico das cascas dos caules de <i>Solanum pseudoquina</i>
SPBB	<i>pseudoquina</i>
DMSO	Dimetilsufóxido
pH	Potencial hidrogeniônico
CQ	Cloroquina
LaBMAT	Laboratório de Biologia da Malária e Toxoplasmose

SUMÁRIO

RESUMO.....	5
ABSTRACT.....	6
INTRODUÇÃO.....	10
MATERIAL E MÉTODOS.....	16
RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	19
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	22
REFERÊNCIAS.....	24

1 INTRODUÇÃO

Com altos índices de mortalidade, a malária é uma das principais doenças infecciosas do mundo, sendo endêmica nas regiões tropicais. Em regiões não tropicais o número de casos vem crescendo devido ao diagnóstico tardio e ao aumento da resistência aos antimaláricos. Em 2015, foram registrados 214 milhões de casos e 418 mil mortes por malária, sendo a maioria delas de crianças com menos de cinco anos (WHO, 2015). No Brasil, para o mesmo ano, foram reportados 313 casos da doença (BRASIL, 2015).

Também chamada de maleita, paludismo, impaludismo, febre terçã ou febre quartã, a malária é uma infecção causada por protozoários eucariontes unicelulares pertencentes ao Grupo Alveolata, família *Plasmodiidae* e ao gênero *Plasmodium*, sendo transmitida pela fêmea do mosquito *Anopheles*. É caracterizada pelos sintomas clínicos de ciclos de febre, calafrios e dores de cabeça, podendo afetar rins, fígado e o sistema nervoso, causando dano cerebral que pode levar a graves complicações nos infectados e resultar em morte (ALENCAR FILHO *et al.*, 2014; NEVES *et al.*, 2016; TOMCHINSKY *et al.*, 2017).

Atualmente são conhecidas cerca de 150 espécies de *Plasmodium*, entretanto, apenas cinco espécies podem parasitar o homem: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. knowlesi*, sendo o *P. vivax* o mais frequente no Brasil, seguido por *P. falciparum* (ALENCAR FILHO *et al.*, 2014; TOMCHINSKY *et al.*, 2017). Essas espécies diferenciam entre si quanto a sua morfologia, aspectos imunológicos, distribuição geográfica, padrões de recidiva e resistência a drogas.

O ciclo de vida do *Plasmodium* (Figura 1) é heteroxênico, ou seja, o parasita infecta dois tipos de hospedeiros: o vertebrado e o invertebrado. Durante o repasto sanguíneo, a fêmea do mosquito *Anopheles* inocula esporozoítos, os quais invadem os hepatócitos, onde sofrem esquizogonia, uma reprodução do tipo assexuada, podendo ficar dormentes na forma de hipnozoítos, dependendo da espécie, ou se diferenciar em merozoítos. Após a ruptura dos hepatócitos, os merozoítos caem na corrente sanguínea e infectam os eritrócitos. Uma vez no interior das hemácias, os merozoítos se transformam em trofozoítos jovens, caracterizados pelo formato de anel, que posteriormente se diferenciam para o estágio de trofozoíto maduro, os quais dão origem a esquizontes. Em seguida, os esquizontes se rompem e provocam a lise da

hemácia, liberando assim vários merozoítos na corrente sanguínea aptos a infectar novos eritrócitos. É o ciclo eritrocítico assexuado o responsável pelos sintomas clínicos da malária (NEVES *et al.* 2016; CDC, 2016).

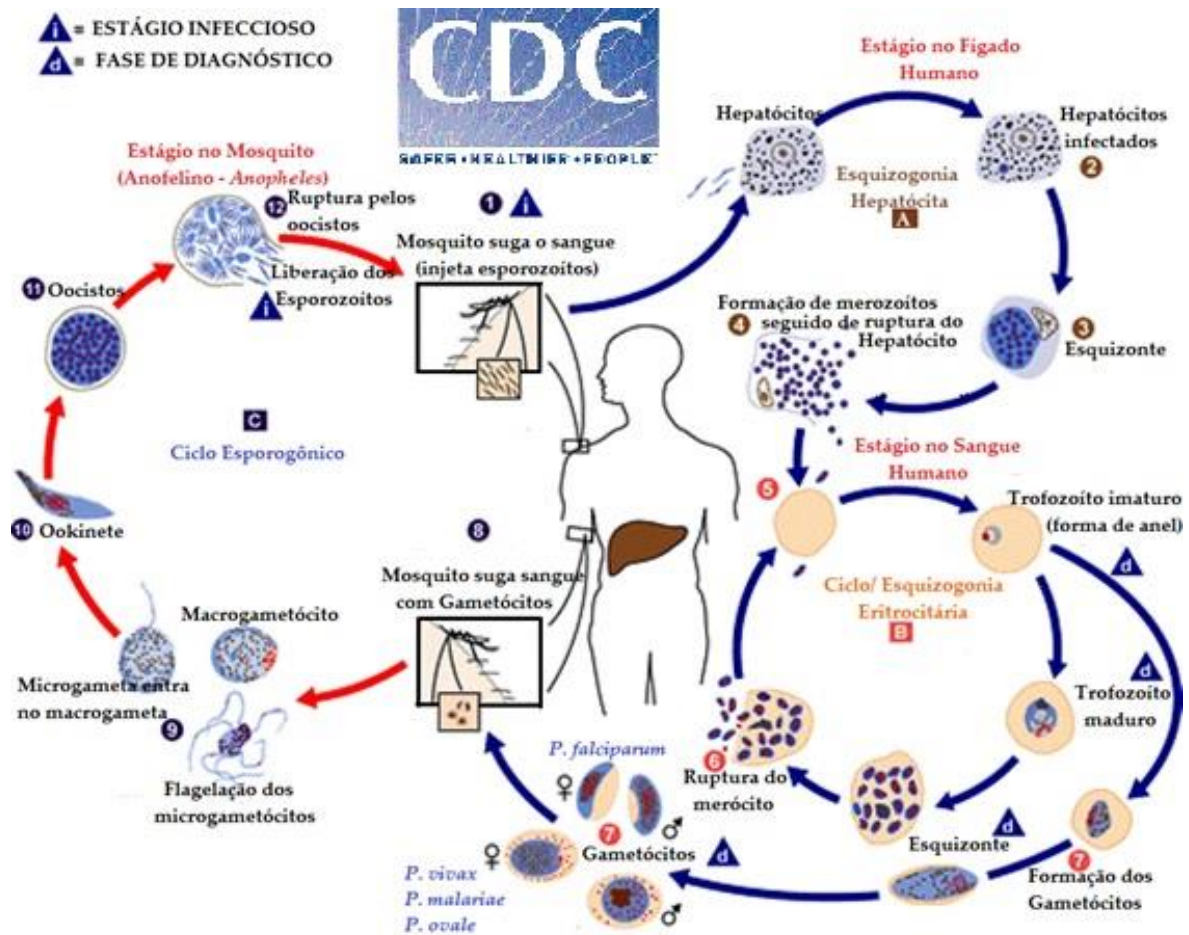


Figura 1: Ciclo de vida do *Plasmodium falciparum*. Fonte: CDC, 2016.

Entretanto, alguns merozoítos, ao invés de se diferenciarem em trofozoítos jovens, podem se diferenciar nos estágios sexuais do parasita: os gametócitos. São estas as formas que evoluem no vetor, dando origem ao ciclo sexual ou esporogônico. O vetor adquire tanto o microgametócito (macho) quanto o macrogametócito (fêmea) durante o repasto sanguíneo. Estas formas vão até o estômago do mosquito, onde o microgametócito fecunda o macrogametócito, gerando um zigoto que evolui para oocineto. No intestino médio, o oocineto invade o tecido epitelial e encista, sendo então denominado de oocisto. Por sua vez, o oocisto sofre um processo de divisão esporogônica no qual origina esporozoítos, que se dirigem para as glândulas salivares do mosquito, estando aptos a infectarem um novo

hospedeiro humano. O ciclo acontece em intervalos regulares e a duração depende da espécie que causa a infecção, sendo de 48 horas para *P. falciparum* e *P. vivax* (NEVES *et al.*, 2016; CDC, 2016).

A fim de prevenir uma maior propagação da infecção na comunidade, a malária deve ser prontamente reconhecida e tratada. Para isso, deve-se suspeitar da doença sempre que o paciente possuir histórico de viagens para áreas endêmicas e apresentar os sintomas clínicos. Entretanto, para um diagnóstico definitivo, testes laboratoriais devem detectar a presença do parasita (por identificação em distensões sanguíneas) ou de seus metabólitos (detectados por testes de imunocromatografia). Além disso, deve-se também solicitar hemogramas e exames de bioquímica com o intuito de se detectar possível anemia, hipoglicemia, insuficiência renal, hiperbilirrubinemia e distúrbios ácido-básico. O diagnóstico clínico baseia-se nos sintomas da malária (tais como febre, dores de cabeça, calafrios, sudorese, dores musculares, náuseas e vômitos) e nos achados do exame físico (como temperatura elevada, transpiração e cansaço) que não são específicos sendo também encontrados em outras doenças a exemplo da gripe e de outras infecções virais comuns. Assim sendo, em áreas não endêmicas, muitas vezes a malária é confundida com outras doenças e isso dificulta e atrasa o diagnóstico uma vez que os profissionais da saúde não estão familiarizados com a doença, não a consideram e não solicitam os testes necessários (CDC, 2015).

Desse modo, o objetivo primário da terapêutica da malária deve ser a rápida e completa eliminação do parasita de forma a evitar o agravamento da doença. Para isso, vários fatores devem ser levados em consideração quanto ao controle da malária tais como: a presença de mudanças sociais e ecológicas; as características biológicas, antropológicas, culturais e sociais da população; intensidade e periodicidade da transmissão da malária; as espécies de mosquitos vetores, seu comportamento e sua susceptibilidade aos inseticidas; características dos serviços de saúde existentes e as espécies dos parasitos e sua sensibilidade aos antimaláricos usuais. Além disso, o estado clínico do paciente bem como qualquer doença ou condição previamente existente a exemplo de gravidez, deficiência de glicose-6-fosfato-desidrogenase (G6PD), talassemias, anemia falciforme, anemia ferropriva, entre outras, também deve ser avaliado. Assim sendo, o diagnóstico deve ser precoce e o tratamento deve ser iniciado o mais rápido possível (CDC, 2017).

As atuais estratégias para reduzir a malária consistem basicamente no controle de vetores e quimioterapia. Nesse tocante, faz-se necessário a identificação precoce do *Plasmodium* infectante com tratamento medicamentoso feito com a associação de pelo menos dois antimaláricos diferentes, com o intuito de intervir em pelo menos duas das fases do ciclo de vida do parasita. Os medicamentos utilizados no tratamento da malária, basicamente, têm duas funções: primeiro de prevenir a progressão para a doença grave e limitar o desenvolvimento de gametócitos, impedindo a transmissão aos mosquitos e, em segundo lugar, prevenir a malária nas áreas endêmicas através de estratégias de quimioprofilaxia. A maioria das drogas utilizados na terapêutica da malária são ativas contra as formas sanguíneas (responsáveis pela sintomatologia da doença) tais como a cloroquina, mefloquina, quinina, quinidina, doxiciclina (usada em combinação com quinina), clindamicina (usada em combinação com quinina), artesunato (artemisinina) entre outros (CDC, 2017).

Com a crescente resistência a medicamentos mais antigos, a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda a terapia combinada com base em artemisinina (*artemisinin-based combination therapy* – ACT) para o tratamento da malária, uma vez que a terapia de combinação se torna uma alternativa ao “atrasar” a resistência do parasita aos antimaláricos, já que a probabilidade de desenvolvimento de resistência simultânea a dois agentes quimioterápicos com independentes mecanismos de ação é extremamente baixa. No entanto, a cloroquina e a primaquina ainda continuam sendo os fármacos de primeira escolha para a cura da malária causada por *P. vivax* na maioria das regiões (BLOLAND; ETTLING; MEEK, 2000; CUI *et al.*, 2015). Além disso, a primaquina é ativa contra as formas hepáticas do parasita (hipnozoítos) e evita as recidivas, mas não pode ser usada por mulheres grávidas e por pessoas com deficiência de G6PD (CDC, 2017). Os medicamentos antimaláricos atualmente disponíveis estão listados na Figura 2.

A cloroquina, foi durante muito tempo o padrão-ouro no tratamento da malária não complicada, porém já não é mais apropriada devido à resistência da maioria das cepas de *P. falciparum* a este fármaco. Já a amodiaquina possui eficácia adequada contra muitos parasitas resistentes à cloroquina e é alternativa nesses casos. A piperaquina, foi muito utilizada tanto para tratar quanto para prevenir a malária na China há algumas décadas passadas, mas tem seu uso caindo em consequência do aumento da resistência. Entretanto, recentemente, a piperaquina tem sido usada com

um componente de ACT e vem sendo bastante utilizada na forma de dihidroartemisinina/piperaquina (CUI *et al.*, 2015).

Antimalárico	Uso
Cloroquina	Tratamento de malária não falcípara
Amodiaquina	Usada em parceria com ACT
Piperaquina	Usada em parceria com o ACT dihidroartemisinina
Primaquina	Cura radical e profilaxia para malária por <i>P. vivax</i> e <i>P. ovale</i> . Droga anti-gametócitos para <i>P. falciparum</i> .
Quinina	Tratamento para malária severa e malária por <i>P. falciparum</i> .
Mefloquina	Profilaxia e droga parceira de ACT para tratamento de malária falcípara
Artemeter	ACT
Artesunato	ACT. Tratamento da malária severa.
Dihidroartemisinina	ACT. Combinação com piperaquina

Figura 2: Antimaláricos atualmente disponíveis. Fonte: Adaptado de (CUI *et al.*, 2015).

Outro fármaco usado na terapia da malária é a primaquina que tem certa atividade contra os estágios eritrocíticos, mas atua principalmente contra os estágios hepáticos (hipnozoítos) tanto do *P. falcifarum* quanto para *P. vivax*. Além disso, a primaquina também age contra os gametócitos o que reduz a transmissão para a fêmea do *Anopheles*. A quinina é um alcaloide que foi primeiramente identificado e isolado da casca de plantas *Cinchona* e é popularmente conhecida como quina no Brasil. Ela tem sido usada no tratamento da malária por mais de 350 anos, em especial nos casos de resistência à cloroquina. No entanto, devido à sua baixa tolerância, seu uso é limitado às formas graves da doença (ANDRADE-NETO *et al.*, 2003; CUI *et al.*, 2015).

Todavia, a mais importante nova classe de antimaláricos é a artemisinina. Ela foi desenvolvida a partir de produtos naturais na China, possuindo uma potente ação antiplasmodial e tem seus derivados como componentes de ACTs como, por exemplo, artesunato, arteméreo e dihidroartemisinina. A utilização das artemisininas de forma isolada não é recomendada pela OMS como forma de evitar a seleção de uma

resistência a essa importante classe de drogas. Este fármaco é altamente eficaz contra a malária em seu estado agudo e, por possuir uma ação curta, protege contra a seleção de resistência (CUI *et al.*, 2015).

Em consequência da crescente resistência, a eficácia desses fármacos de ação antimalárica está sendo limitada, e recentes evidências sugerem que os parasitas também estão se tornando resistentes aos mais novos agentes. A resistência já foi descrita para quase todos os medicamentos disponíveis e, para muitas dessas drogas, os mecanismos de resistência são desconhecidos (CUI *et al.*, 2015). Além disso, o uso indiscriminado e/ou inadequado de medicamentos e a própria evolução do *Plasmodium* contribuem para o desenvolvimento de resistência aos antimaláricos utilizados na terapêutica, o que leva a uma necessidade crescente de se identificar novos compostos de ação antiplasmodial. Assim sendo, a pesquisa de substâncias extraídas de plantas medicinais pode ser promissora para a descoberta de compostos eficientes para o controle da malária (TOMCHINSKY *et al.*, 2017).

Sabe-se que a etnofarmacologia refere-se a uma triagem nacional baseada na seleção de plantas usadas na medicina popular e tem se mostrado bastante promissora e satisfatória no descobrimento de novos medicamentos. Como país de maior biodiversidade do mundo, muitas delas endêmicas, o Brasil abre caminho favorável à abordagem etnofarmacológica na busca de novas drogas mais ativas e menos tóxicas contra a malária. A flora brasileira apresenta uma gigantesca fonte de moléculas com potencial farmacológico ainda inexploradas. Alguns exemplos de substâncias que foram derivadas de plantas e vem sendo usadas por povos indígenas são os extratos de folhas de jaborandi (*Pilocarpus jaborandi*), sementes de guaraná (*Paullinia cupana*) ricas em cafeína e usada como estimulante e curares extraídos de folhas de *Chondondendrom* spp. usados como anestésicos (ANDRADE-NETO *et al.*, 2007).

Popularmente conhecida como quina, quina de São Paulo, a *Solanum pseudoquina* (Figura 3) pertence à família das *Solonaceae* e é uma árvore pequena, ramificada, desprovida de espinhos, com casca bastante fina de textura lisa. Suas folhas são simples e de bordas lisas enquanto que suas flores são brancas e perfumadas. É típica da mata latifoliada semidecidual de altitude, ocorrendo nos estados de Minas Gerais, São Paulo e Paraná. Sua madeira é empregada na confecção de caixotes, lápis, palitos de fósforo, lenha, etc., e sua casca possui uso

medicinal com propriedades febrílicas, sendo extremamente amarga e levemente solúvel em água (SAINT-HILAIRE, 2009; CASTELLANI; AGUIAR; PAULA, 2009).



Figura 3: *Solanum pseudoquina*. Fonte: (GIEHL, 2008).

A atividade antimalárica de espécies de plantas medicinais usadas no Brasil têm sido testadas tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Neste trabalho, nós estudamos as quininas usadas no tratamento da febre e da malária, extraídas de *Solanum pseudoquina* com o objetivo avaliar a atividade antimalárica através de experimentos *in vitro* com *Plasmodium falciparum* (cepa 3D7), uma vez que, as complicações e mortes por malária e a maioria das infecções resistentes às drogas são decorrentes de infecções por *P. falciparum* (parasita mais virulento do homem), contribuindo assim com possíveis ações terapêuticas alternativas e/ou complementares à terapêutica tradicional.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo foi conduzido a partir de pesquisa experimental. O experimento foi realizado usando cepa *Plasmodium falciparum* 3D7 (sensível a

cloroquina) cultivada usando o método de Trager e Jensen (1976) mantidas a uma atmosfera com baixo nível de oxigênio (O₂) por meio de ventilação com mistura carbogênica na proporção de 5% de gás carbônico (CO₂), 3% de O₂ e 92% de nitrogênio (N₂), temperatura de 37 °C, hematócrito de 10% e meio de cultura RPMI-1640 complementado.

Extrato de <i>Solanum pseudoquina</i>	Sigla
Extrato etanólico das folhas	SPLE
Fração do extrato etanólico das cascas dos caules A	SPBA
Fração do extrato etanólico das cascas dos caules N	SPBN
Extrato etanólico das cascas das raízes	SPRE
Extrato etanólico das cascas dos caules	SPBE
Fração do extrato etanólico das cascas dos caules B	SPBB

Figura 4: Extratos de *Solanum pseudoquina*.

Foram testados seis extratos obtidos de *Solanum pseudoquina* (Figura 4). Essas amostras foram gentilmente cedidas pelo grupo do Prof. Eloir Schenkel do Departamento de Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). A obtenção das frações foi realizada, de forma simplificada, da seguinte maneira: do extrato etanólico inicial SPBE (A) foi separado duas porções com acetato de etila, resultando em parte alcaloide e parte livre de alcaloide. A parte livre de alcaloide foi chamada de SPBN (B). Posteriormente, a parte alcaloide foi tratada com HCl 0,1% e em seguida com NH₄OH, resultando em um extrato neutro, que por sua vez foi dividido em duas partes. A primeira foi dissolvida em acetato de etila, resultando no extrato SPBA (C) e na segunda parte foi adicionado n-butanol para originar a última fração SPBB (D), espera-se que em SPBB esteja os alcaloides de maior polaridade (Figura 5).

Inicialmente havia 10,6 mg de SPLE; 10,2 mg de SPBA; 10,2 mg de SPBN; 10,2 mg de SPRE; 10,5 mg de SPBE; e 8,5 mg de SPBB. Para o teste de avaliação de atividade antimalárica, todos os extratos foram dissolvidos em 1 mL de dimetilsufóxido (DMSO) a 1%, resultando em soluções estoques. A partir dessas soluções estoques, procedeu-se as diluições seriadas 1:2 (sete concentrações) variando de 50 µg/mL a 0,78 µg/mL para cada composto em meio RPMI complementado. Utilizou-se uma microplaca (96 poços) de polietileno de fundo chato,

na qual 100 µL da cultura previamente sincronizada de *P. falciparum* 3D7 com predominância de anel, parasitemia de 1% e hematócrito de 3% recebeu tratamento com 100 µL os extratos diluídos previamente em diluição seriada acima citada. Após esse tratamento, a microplaca foi incubada a 37°C, durante 48 horas, sob baixa pressão de O₂. Como controle para o teste foi utilizado uma cultura sincronizada com 1% de parasitemia e livre da ação de fármacos.

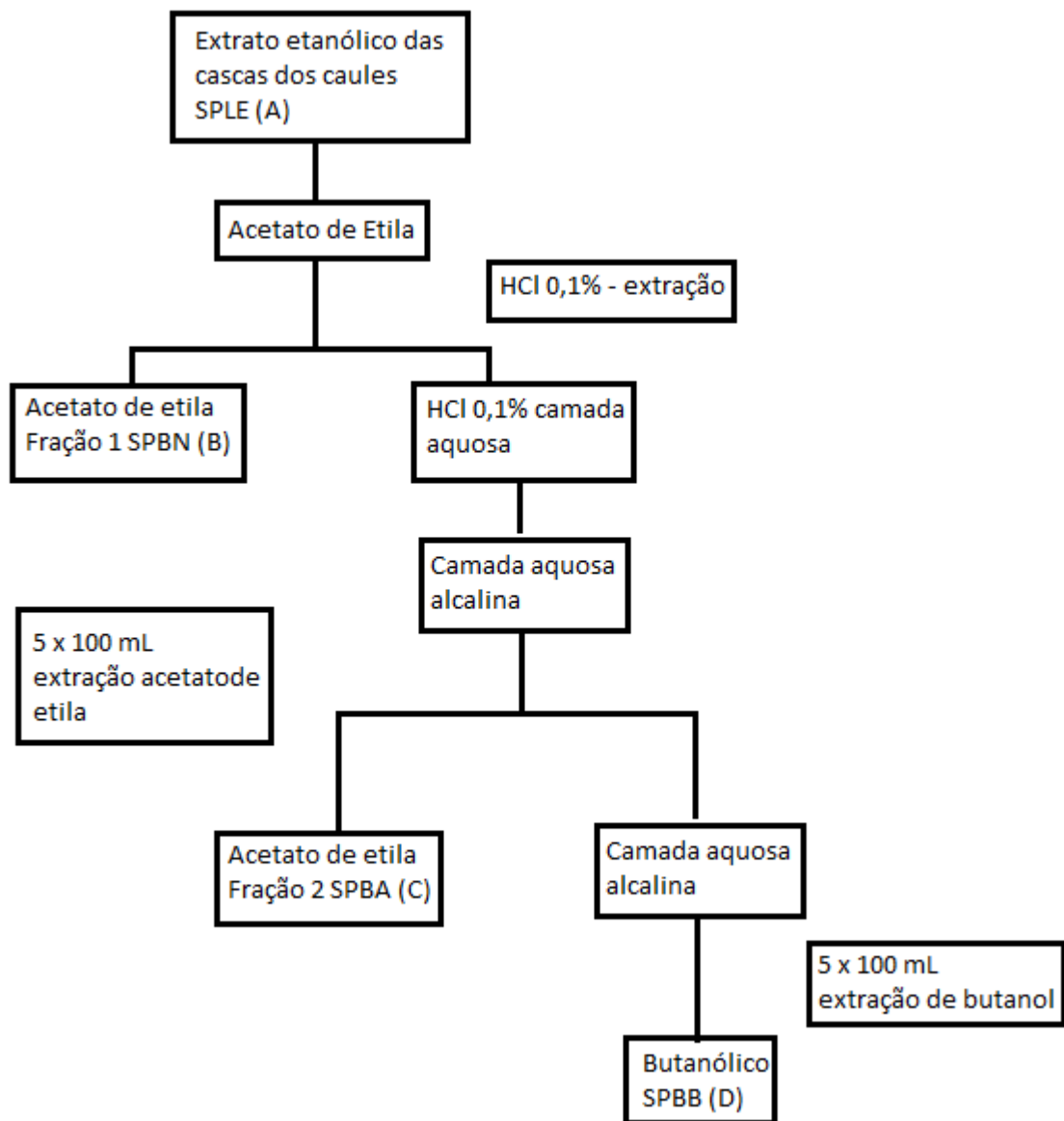


Figura 5: Fluxograma da obtenção de SPBN, SPBA e SPBB.

Ao término das 48 horas de incubação da microplaca, o meio de cultivo foi retirado de todos os poços com o auxílio de uma bomba a vácuo acoplada a uma

pipeta Pasteur e esfregaços sanguíneos de cada poço foram confeccionados e corados com coloração panótico para posterior leitura da parasitemia em microscópio óptico. A atividade antimalária foi determinada pela inibição do crescimento de *P. falciparum* nos poços tratados com os compostos em relação ao controle de crescimento livre (apenas meio de cultura RPMI complementado e hemácias da cultura). O teste foi feito em triplicata.

Como medida de citotoxicidade *in vitro* foi avaliado a taxa de hemólise causada pelos extratos às hemácias humanas não parasitadas. O teste de hemólise foi realizado conforme descrito por Rabelo *et al.* (2012). Foram testados volumes de 50 µL, 100 µL e 150 µL das soluções estoques de cada extrato. Nesse teste, os eritrócitos foram utilizados em solução com 1 mL de hemácias para 99 mL de tampão fosfato pH 7,2. Desta solução, 50 µL, 100 µL e 150 µL foram adicionados a 50 µL, 100 µL e 150 µL de cada extrato, respectivamente (1:1) e posteriormente incubados a 37°C por 60 minutos. Após isso, as amostras foram centrifugadas a 3.000 rpm por 2 minutos e alíquotas dos sobrenadantes foram transferidas para uma microplaca de 96 poços. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 650 nm. Como controle positivo (100% de hemólise) e controle negativo (0% de hemólise) foram utilizadas 100 µL da solução de hemácias com 100 µL de Triton X-100 e solução salina 0,9%, respectivamente. O ensaio foi realizado em triplicata e a taxa de hemólise foi calculada a partir da equação abaixo:

$$\% \text{ hemólise} = \frac{\text{Abs. amostra} - \text{Abs. controle negativo}}{\text{Abs. controle positivo} - \text{Abs. controle negativo}} \times 100$$

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Após a realização dos experimentos foi possível notar que os extratos de *Solanum pseudoquina* demonstraram possuir atividade antimalária sobre o *Plasmodium falciparum* cepa 3D7. Em maiores concentrações (50 µg/mL e 25 µg/mL) os extratos mostraram resultados mais eficientes reduzindo a parasitemia em 92,3% para SPLE, SPBE e SPBB e em 88,46% para SPBA, SBPN e SPRE enquanto que, em menores concentrações (0,78 µg/mL) a atividade do extrato foi observada com menor efeito (Figura 6).

Concentração (µg/mL)	Extratos de <i>Solanum pseudoquina</i>					
	SPLE	SPBA	SPBN	SPRE	SPBE	SPBB
50	92,3%	88,46%	88,46%	88,46%	92,3%	92,3%
25	84,61%	84,61%	73,07%	80,76%	84,61%	76,92%
12,5	65,38%	65,38%	61,53%	73,07%	76,92%	73,07%
6,25	53,84%	53,84%	50%	61,53%	69,23%	69,23%
3,125	61,53%	57,69%	53,85%	46,15%	57,69%	65,38%
1,5625	50%	50%	34,61%	46,15%	34,61%	61,53%
0,78	50%	50%	7,69%	50%	57,69%	65,38%

Figura 6: Atividade *in vitro* dos extratos contra o *Plasmodium falciparum* (3D7) - Redução da Parasitemia

Como demonstrado no gráfico abaixo (Figura 7), ao final do teste a parasitemia do controle foi de 2,6% e, portanto, os extratos foram capazes de reduzir essa parasitemia para próximo da metade (1,3%), com exceção da menor concentração da SPBN, que mostrou ser ineficaz em atividade antiplasmodial.

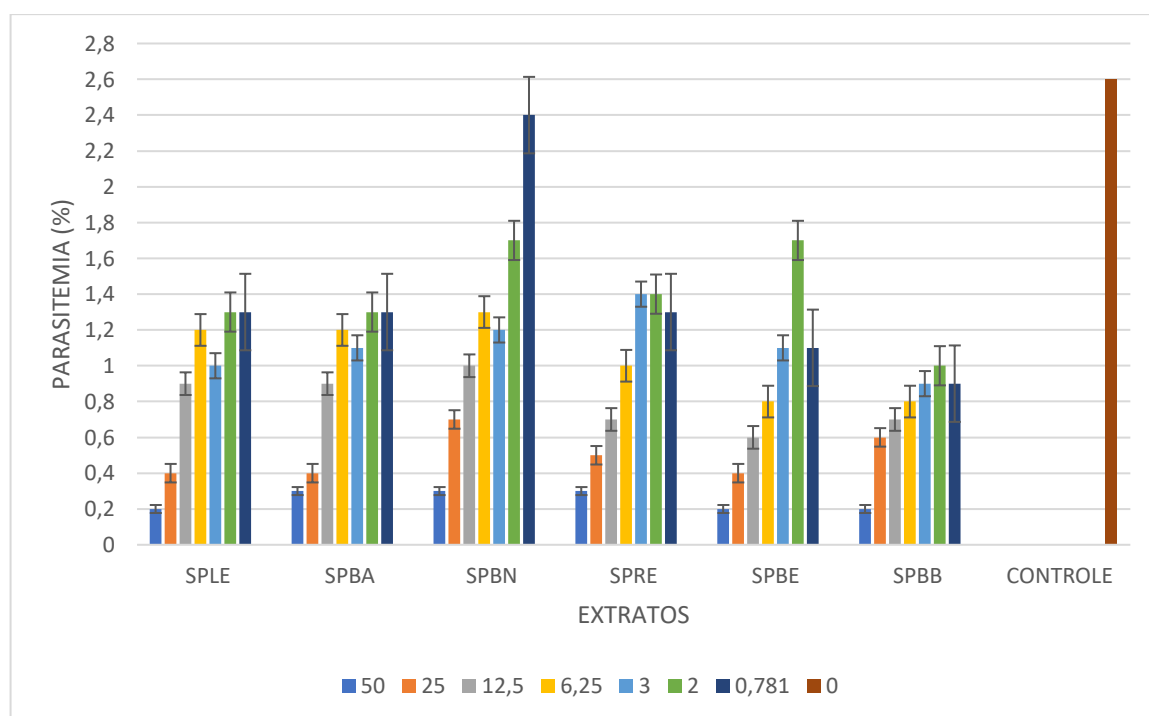


Figura 7: Efeito dos extratos na parasitemia. * CQ = 0,026 µM ± 0,02 (0,013) – ação da cloroquina usado como padrão de controle positivo (Fonte: dados obtidos em estudos anteriores do LaBMAT)

O extrato SPLE possui uma atividade bem consistente assim como o SPBA, os quais tiveram resultados muito próximos. O extrato SPBN demonstrou boa atividade até a concentração de 3 µg/mL, após isso sua atividade reduz, tendo em sua menor concentração (0,78 µg/mL) quase nenhuma atividade, visto que apresentou uma parasitemia de 2,4%, valor bem próximo ao controle (2,6%). Quanto ao SPBE, teve uma atividade regular perdendo atividade proporcionalmente ao passo que sua atividade foi reduzindo até a concentração de 2 µg/mL. Já o extrato SPBB demonstrou possuir uma atividade satisfatória nas suas diferentes concentrações. Não há grande diferença de atividade entre elas, sendo a concentração de 2 µg/mL a que apresentou menor atividade e na concentração de 50 µg/mL com melhor atividade. Esse extrato é um bom candidato para testes com uma amplitude maior de concentrações, objetivando isolar os componentes ativos.

Somado a estes dados, realizou-se um teste de hemólise em hemácias não parasitadas com o intuito de conferir quais extratos eram capazes de causar hemólise, sendo a presença de hemólise indicativo de toxicidade. Os extratos foram testados em três volumes diferentes.

Ao verificar os resultados no gráfico abaixo (Figura 8), nota-se claramente que os extratos SPBA e SPBN causaram hemólise de forma muito significativa frente aos demais. Por isso, esses extratos foram considerados inadequados devido a sua toxicidade.

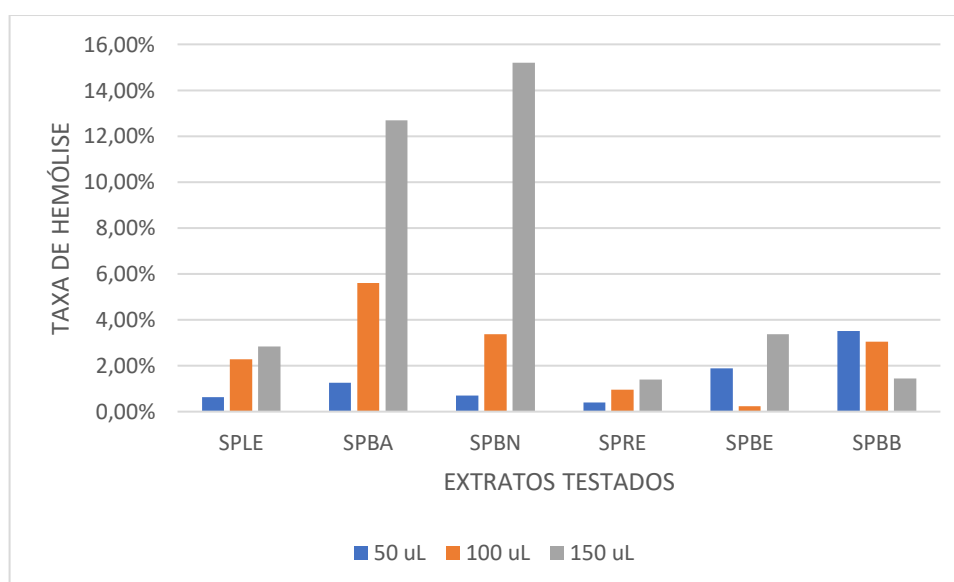


Figura 8: Teste de hemólise.

Os extratos SPBA e SPBN causaram maior hemólise no maior volume. O extrato SPRE teve um comportamento semelhante ao SPLE, porém com menor intensidade. Todavia, sua atividade contra o parasito foi inferior. O SPBE causou mais hemólise no menor e no maior volume, sendo o volume de 100 μ L próximo de 0%. Quanto ao SPBB, houve menor hemólise no maior volume.

Após a exclusão dos extratos que causaram hemólise, foi realizado uma comparação íntima entre SPLE, SPRE, SPBE e SPBB (Figura 9). Nessa comparação foi possível observar que tanto SPLE quanto SPBB tiveram os melhores resultados uma vez que tiveram curvas quase que ideais no teste de hemólise e tiveram bons desempenho na redução da parasitemia, com mínimos de 50% para o SPLE e de 61,53% para o SPBB.

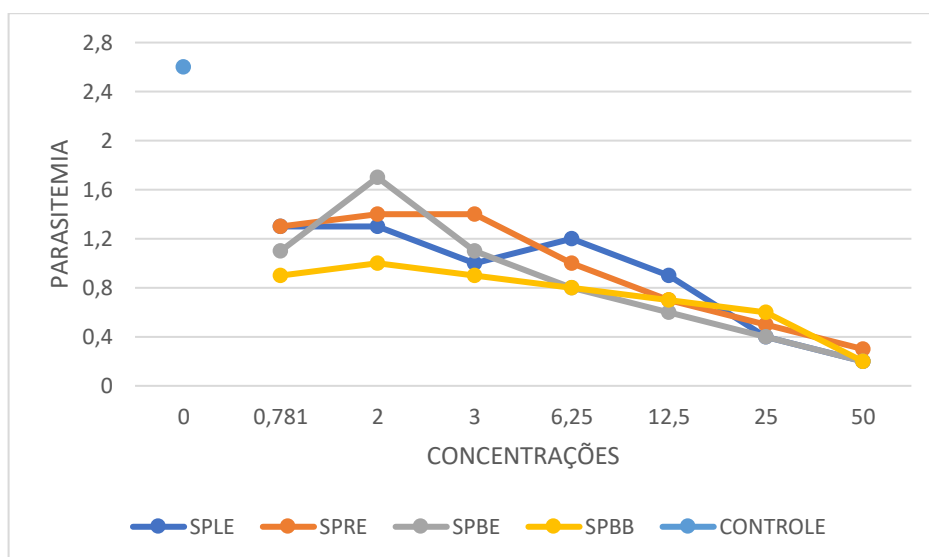


Figura 9: Perfil de sobrevivência de *P. falciparum* após incubação por 48 h com extratos etanólicos de *Solanum pseudoquina*.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O controle da malária atualmente é realizado através da terapia farmacológica, uma vez que não há vacinas eficazes disponíveis em virtude do ciclo de vida do *Plasmodium* ser complexo, envolvendo diversas formas evolutivas. Além disso, o controle do mosquito vetor é dificultado visto que eles podem adquirir resistência aos inseticidas (ARAMA; TROYE-BLOMBERG, 2014).

O desenvolvimento de resistência de fármacos fundamentais como a cloroquina e o uso controlado de novos análogos de artemisinina, criaram uma necessidade urgente de se descobrir novos agentes antimaláricos. Até o momento, não existe uma droga ideal, com as mesmas características da cloroquina: baixo custo, pouca toxicidade e eficácia. Em geral, todas as drogas causam efeitos tóxicos.

Em decorrência disso, esse trabalho foi proposto devido à preocupação em se buscar novas drogas com potencial terapêutico para o tratamento da malária já que a resistência aos fármacos atualmente disponíveis foi amplamente documentada em diferentes países (MENEGUETTI *et al.*, 2014).

Assim, esse estudo é de grande importância visto que os resultados obtidos nos permitem afirmar que os extratos etanólicos de *Solanum pseudoquina* apresentaram atividade antimalárica *in vitro* contra o *Plasmodium falciparum* cepa 3D7 ao passo que algumas demonstraram toxicidade contra os eritrócitos. Assim, SPLE e SPBB se mostraram promissores e, portanto, pesquisas futuras deverão ser realizadas com o propósito de otimizar o efeito antimalárico desses extratos e de se identificar os responsáveis pelo efeito e propiciar estudos para a síntese dos compostos ativos majoritários e diminuir assim a citotoxicidade.

REFERÊNCIAS

ALENCAR FILHO, Aristóteles Comte de et al. Malaria and Vascular Endothelium. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, [s.l.], p.165-169, 2014. <http://dx.doi.org/10.5935/abc.20140088>. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0066-782X2014002000012&lng=en&nrm=iso&tlng=pt#B03>. Acesso em: 07 nov. 2017.

ANDRADE-NETO, V.f. et al. Antimalarial activity of Cinchona-like plants used to treat fever and malaria in Brazil. **Journal Of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 87, n. 2-3, p.253-256, ago. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0378-8741\(03\)00141-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0378-8741(03)00141-7). Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874103001417?via=ihub>>. Acesso em: 05 dez. 2017.

ANDRADE-NETO, Valter F de et al. In vitro inhibition of Plasmodium falciparum by substances isolated from Amazonian antimalarial plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s.l.], v. 102, n. 3, p.359-366, jun. 2007. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0074-02762007000300016>. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762007000300016&lng=en&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 05 dez. 2017.

ARAMA, C.; TROYE-BLOMBERG, M. The path of malaria vaccine development: challenges and perspectives. **Journal Of Internal Medicine**, [s.l.], v. 275, n. 5, p.456-466, 18 abr. 2014. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/joim.12223>. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/joim.12223/full>>. Acesso em: 03 dez. 2017.

BLOLAND, Peter B.; ETTLING, Mary; MEEK, Sylvia. Combination therapy for malaria in Africa: hype or hope? **Bull World Health Organ**, [s.l.], v. 12, n. 78, p.1378-1388, jan. 2000. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2560651/pdf/11196485.pdf>>. Acesso em: 05 dez. 2017.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE/SVS - SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO. (Org.). **Malária - Casos Confirmados Notificados No Sistema De Informação De Agravos De Notificação - Brasil**. 2015. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/malabr.def>>. Acesso em: 07 nov. 2017.

CASTELLANI, Estela Dalpim; AGUIAR, Ivor Bergemann de; PAULA, Rinaldo César de. Bases para a padronização do teste de germinação em três espécies de Solanum L. **Revista Brasileira de Sementes**, [s.l.], v. 31, n. 2, p.77-85, 2009. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0101-31222009000200009>. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-31222009000200009&lang=pt>. Acesso em: 02 dez. 2017.

CDC, Centers For Disease Control And Prevention. **Malaria Diagnosis (United States)**. 2015. Disponível em: <https://www.cdc.gov/malaria/diagnosis_treatment/diagnosis.html>. Acesso em: 02 dez. 2017.

CDC, Centers For Disease Control And Prevention. **Malaria: Biology**. 2016. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/index.html>>. Acesso em: 09 nov. 2017.

CDC, Centers For Disease Control And Prevention. **Malaria Treatment (United States)**. 2017. Disponível em: <http://www.cdc.gov/malaria/diagnosis_treatment/treatment.html>. Acesso em: 02 dez. 2017.

CUI, Liwang et al. Antimalarial Drug Resistance: Literature Review and Activities and Findings of the ICEMR Network. **The American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene**, [s.l.], v. 93, n. 3, p.57-68, 2 set. 2015. American Society of Tropical Medicine and Hygiene. <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.15-0007>. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4574275/>>. Acesso em: 28 nov. 2017.

GIEHL, Eduardo Luís Hettwer. **Flora Digital: Solanum pseudoquina A. St.-Hill.** 2008. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=802>. Acesso em: 03 dez. 2017.

NEVES, David Pereira *et al.* **Parasitologia Humana.** 13^a ed. São Paulo: Atheneu, 2016.

RABELO, Luciana *et al.* A Lactose-Binding Lectin from the Marine Sponge *Cinachyrella Apion* (Cal) Induces Cell Death in Human Cervical Adenocarcinoma Cells. **Marine Drugs**, [s.l.], v. 10, n. 12, p.727-743, 28 mar. 2012. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/md10040727>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22690140>>. Acesso em: 11 dez. 2017.

SAINT-HILAIRE, Auguste de. **Plantas usuais dos brasileiros.** Belo Horizonte: Código Comunicação, 2009. 392 p. Disponível em: <<http://www.ceplamt.org.br/wp-content/uploads/2014/02/Plantas-usuais-dos-brasileiros.pdf>>. Acesso em: 30 nov. 2017.

TOMCHINSKY, Bernardo *et al.* Ethnobotanical study of antimalarial plants in the middle region of the Negro River, Amazonas, Brazil. **Acta Amazonica**, [s.l.], v. 47, n. 3, p.203-212, jul. 2017. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1809-4392201701191>. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0044-59672017000300203>. Acesso em: 26 nov. 2017.

TRAGER, W; JENSEN, J.. Human malaria parasites in continuous culture. **Science**, [s.l.], v. 193, n. 4254, p.673-675, 20 ago. 1976. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.781840>. Disponível em:

<<http://science.sciencemag.org/content/193/4254/673.long>>. Acesso em: 26 nov. 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Health Observatory (GHO) data**. 2015. Disponível em: <<http://www.who.int/gho/malaria/en/>>. Acesso em: 07 nov. 2017.