



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E ESTUDO DA ATIVIDADE DO EXTRATO
ETANÓLICO SECO DOS BULBOS DE *Eleutherine plicata* Herb (Iridaceae)
SOBRE PARÂMETROS DO ESTRESSE OXIDATIVO NA MALÁRIA
EXPERIMENTAL *IN VIVO***

Thiago Leite da Silva

BELÉM – PA

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAUDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E ESTUDO DA ATIVIDADE DO EXTRATO
ETANÓLICO SECO DOS BULBOS DE *Eleutherine plicata* Herb (Iridaceae)
SOBRE PARÂMETROS DO ESTRESSE OXIDATIVO NA MALÁRIA
EXPERIMENTAL *IN VIVO***

Autor: Thiago Leite da Silva

Orientador: Prof. Dr. Flávio de Vasconcelos

Co-Orientador: Prof. Dr. Sandro Percário

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração em Fármacos e Medicamentos, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

BELÉM - PA

2012

FOLHA DE APROVAÇÃO

Thiago Leite da Silva

“Avaliação da toxicidade e estudo da atividade do extrato etanólico seco dos bulbos de *Eleutherine plicata* Herb. (Iridaceae) sobre parâmetros do estresse oxidativo na malária experimental *in vivo*”

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará como requisito para a obtenção do título de mestre

Área de Concentração: Fármacos e Medicamentos.

Aprovado em; ____/____/_____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Flávio de Vasconcelos

Instituição: UFPA

Assinatura:

Prof. Dr. José Ricardo dos Santos Vieira

Instituição: UFPA

Assinatura:

Prof^a. Dr^a. Maria Fani Dolabela

Instituição: UFPA

Assinatura:

DEDICATÓRIA

A Deus, meu Senhor, que nunca me abandona, mesmo quando todos viram as costas.

A Margareth Leite, minha mãe, e Felipe Leite, meu irmão, que sempre estão lá, me corrigindo, me ouvindo e me sustentando (e suportando) nas horas de escuridão e nos momentos de profunda alegria.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro e acima de tudo a Deus. Sem Ele, nada existiria. Não haveria razão e não haveria motivo. Obrigado meu Deus por estar comigo não só neste trabalho, mas em todos os momentos da minha vida, me aconselhando e ensinando, mais do que todos os livros e artigos deste mundo.

À minha mãe, Margareth Leite de Melo, a pessoa que de fato posso chamar de “Mestra”, que me ensinou e guiou, desde quando eu nem sabia o que eu era, e continuará a fazê-lo até quando Deus quiser.

Ao meu irmão Felipe Leite da Silva, por sempre me lembrar da razão pela qual eu luto. Se eu quero ser melhor do que sou é por que quero te mostrar o caminho.

Ao meu querido amigo, Thyago da Costa Vilhena, o qual me deu a ajuda e o apoio indispensável para que esse trabalho chegasse até onde chegou, além de permitir que minha vida tenha muito mais momentos felizes. Eu realmente não mereço tudo o que fizeste para mim.

À amiga Adriana Veiga, meus braços e pernas nesse trabalho. Sem ela com certeza eu não teria terminado.

Ao meu orientador, Professor Flávio de Vasconcelos, por todo o apoio dado ao longo desses anos de trabalho e aprendizagem.

Aos meus colegas da Casa das Onze Janelas, onde trabalho, com muito orgulho, por sempre me apoiar e me ajudar, mesmo com os pedidos mais absurdos que uma pessoa poderia fazer no auge do desespero (e acreditem, eu com certeza o fiz).

A todas as pessoas que passaram pelo LATOX durante todo o tempo em que estive fazendo este trabalho. Todos, de alguma, maneira contribuíram com ele.

Aos meus amigos: Thaís Andrade, Taís Gabbay, Andressa Brigida, Michel Martins, Dayse Nascimento, Thaisa Schalcher, Fabrício Alexopulos, Antônio Taylon, Ana Carolina, Bruno Pinheiro, Luís Fábio, Amanda Gabrielly, Eduardo Mota, Suellen

Sanches, Edinilza Borges e Mariely Pessoa. Sem vocês, minha sanidade já teria me abandonado há muito tempo.

A todos os professores e colaboradores de todos os (muitos) laboratórios pelo qual eu passei para realizar este trabalho.

Ao PPGCF, pela oportunidade.

A todos os que eu não mencionei, mas que deram sua valiosa contribuição para o término desta etapa da minha vida.

“Aqui está, este é o fim.

Não, este é apenas o começo.

*Eu começo apenas para terminar, e
termino apenas para começar novamente.*

Este foi o caminho que escolhi.

Esta é a convergência

Esta é a minha verdade”

Autoria própria

RESUMO

SILVA, T. L. **Avaliação da toxicidade e estudo da atividade do extrato etanólico seco dos bulbos de *Eleutherine plicata* Herb (Iridaceae) sobre alguns parâmetros do estresse oxidativo na malária experimental *in vivo***. 2012. 113 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Pará, Belém, 2012.

A malária, considerada uma das doenças parasitárias mais graves e complexas, atinge principalmente as regiões tropicais e subtropicais do mundo. O parasito da malária é altamente suscetível às variações oxidativas, que podem estar envolvidas nas complicações das formas graves da doença, bem como na resolução da mesma. Plantas do gênero *Eleutherine* são ricas em compostos naftoquinônicos e derivados, os quais apresentam envolvimento comprovado em parâmetros do estresse oxidativo. Desta maneira, se propõe neste trabalho a avaliação da toxicidade, bem como a verificação do envolvimento do extrato etanólico de *Eleutherine plicata* nas variações oxidativas presentes na malária. Foram realizados testes de citotoxicidade pelo método do MTT, toxicidade preliminar em *Artemia salina* e o teste de toxicidade aguda oral e toxicidade subcrônica de 36 dias (em camundongos *Swiss*) de acordo com o protocolo modificado adotado pela OECD. Também foi feita a avaliação da atividade deste extrato sobre parâmetros oxidativos em modelo de malária murina. Após inoculação do parasito, os animais foram mantidos por até cinco dias e submetidos à eutanásia após este período para retirada do cérebro e pulmão a fim de serem realizados os seguintes ensaios: Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox (TEAC), Malondialdeído (MDA), além da parasitemia sanguínea. Os resultados dos ensaios de toxicidade indicam que o extrato possui baixa toxicidade e o ensaio em malária murina demonstrou que o extrato foi capaz de reduzir a parasitemia, além de sugerir que esta atividade tem relação com um possível efeito pró-oxidante.

Palavras chave: *Eleutherine plicata*; Marupazinho; Malária; Estresse Oxidativo; Toxicidade.

ABSTRACT

SILVA, T. L. **Toxicity evaluation and study of *Eleutherine plicata* Herb (Iridaceae) bulbs dry ethanolic extract over some parameters of oxidative stress on malaria *in vivo*.** 2012. 113 f. Dissertation (Master's Degree) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Pará, Belém, 2012.

Malaria, which is considered one of the most grave and complex parasitic diseases, occurs mainly tropical and subtropical regions of the world. Malaria's parasite is highly susceptible to oxidative variations, which can be both involved on the disease's complications or in its resolution. Plants of *Eleutherine* genre are rich in naphthoquinones and its derivatives, which have demonstrated involvement on oxidative stress parameters. Said so, it is proposed in this study the toxicity evaluation and the observation of the evolution of *Eleutherine plicata* ethanolic extract in the oxidative variations present on malaria. Cytotoxicity tests, toxicity tests on *Artemia salina*, acute and 36 day subchronic toxicity tests accordingly with OECD were made. After that, the evaluation of the extract activity over oxidative parameters on murine malaria was made. The animals were inoculated with the parasite and maintained for five days, and, after that, euthanized for the extraction of its brain and lungs, for the execution of the following assays: Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC), Malondialdehyde (MDA); it was prepared a blood smear for the observation of the animals parasitemia. The toxicity assays indicate that the extract has low toxicity, and the murine malaria assay demonstrated that the extract was able to reduce the parasitemia, and suggests that this activity has relation with a possible pro-oxidant effect.

Keywords: *Eleutherine plicata*; Marupazinho; Malaria; Oxidative Stress; Toxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo biológico do parasita da malária.	24
Figura 2: Reação catalisada pela SOD	27
Figura 3: Reação catalisada pela GSH-Px	27
Figura 4: Reação catalisada pela Catalase	27
Figura 5: Reação de Fenton	28
Figura 6: Reação de Haber-Weiss	28
Figura 7: Peroxidação lipídica	29
Figura 8: Estrutura química da Quinina.	31
Figura 9: Estrutura química da Cloroquina.	31
Figura 10: Estrutura química da Artemisinina.	32
Figura 11: <i>Eleutherine plicata</i> Herb	39
Figura 12: Estrutura química da eleuteriona.	40
Figura 13: Estrutura química do eleuterol.	40
Figura 14: Estrutura química da eleuterina.	41
Figura 15: Resumo esquemático dos procedimentos experimentais	46
Figura 16: Percentual de letalidade de metanauplios de <i>Artemia salina</i> em função das doses do EEEp no período de incubação de 24 horas.	67
Figura 17: Percentual de letalidade de metanauplios de <i>Artemia salina</i> em função das doses do EEEp no período de incubação de 48 horas.	67

Figura 18: Curva dose resposta do EEep em células HepG2A16, mostrando o valor da concentração citotóxica que inibe 50% do crescimento das células (CC₅₀). 69

Figura 19: Curva dose resposta da Cloroquina em células HepG2A16, mostrando o valor da concentração citotóxica que inibe 50% do crescimento das células (CC₅₀). 69

Figura 20: Resultado da contagem de leucócitos totais (10³/mm³) nos animais controle (AM), tratados com EEep 100 mg/kg (BM), tratados com EEep 300 mg/kg (CM) e satélite (DM). 76

Figura 21: Resultado da contagem de hemácias (10⁶) nos animais controle (AM), tratados com EEep 100 mg/kg (BM), tratados com EEep 300 mg/kg (CM) e satélite (DM). 76

Figura 22: Resultados da contagem de hemoglobina (g/dL) nos animais controle (AM), tratados com EEep 100 mg/kg (BM), tratados com EEep 300 mg/kg (CM) e satélite (DM). 77

Figura 23: Resultados da contagem de hematócitos (%) nos animais controle (AM), tratados com EEep 100 mg/kg (BM), tratados com EEep 300 mg/kg (CM) e satélite (DM). 78

Figura 24: Resultados da determinação do Volume Corpuscular Médio (fm^3) nos animais controle (AM), tratados com EEEp 100 mg/kg (BM), tratados com EEEp 300 mg/kg (CM) e satélite (DM). 79

Figura 25: Resultados da determinação da Hemoglobina Corpuscular Média (pg) nos animais controle (AM), tratados com EEEp 100 mg/kg (BM), tratados com EEEp 300 mg/kg (CM) e satélite (DM). 79

Figura 26: Resultados da determinação da Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (g/dL) nos animais controle (AM), tratados com EEEp 100 mg/kg (BM), tratados com EEEp 300 mg/kg (CM) e satélite (DM). 80

Figura 27: Resultados da contagem de Plaquetas ($10^3/mm^3$) nos animais controle (AM), tratados com EEEp 100 mg/kg (BM), tratados com EEEp 300 mg/kg (CM) e satélite (DM). As colunas representam as Médias e as barras, o Desvio Padrão. 81

Figura 28: Valores da parasitemia (%) obtidos de camundongos infectados (INFECTADOS) e infectados e tratados com EEEp com as doses de 300 mg/Kg (TRATADOS) no ensaio de malária murina. 83

Figura 29: Valores de MDA cerebral (ng/mL) obtidos de animais não infectados (CONTROLE), infectados (INFECTADOS) e infectados e tratados com EEep com as doses de 300 mg/Kg (TRATADOS) no ensaio de malária murina. 85

Figura 30: Valores de MDA pulmonar (ng/mL) obtidos de animais controle (CONTROLE), infectados (INFECTADOS) e infectados e tratados com EEep com as doses de 300 mg/Kg (TRATADOS) no ensaio de malária murina 87

Figura 31: Valores da TEAC cerebral (mM/L) obtidos de animais não infectados (CONTROLE), infectados (INFECTADOS) e infectados e tratados com EEep com as doses de 300 mg/Kg (TRATADOS) no ensaio de malária murina. 88

Figura 32: Valores da TEAC pulmonar (mM/L) obtidos de animais não infectados (CONTROLE), infectados (INFECTADOS) e infectados e tratados com EEep com as doses de 300 mg/Kg (TRATADOS) no ensaio de malária murina. 89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Granulomeria do pó de <i>Eleutherine plicata</i>	65
Tabela 2: Ensaio físico-químico do pó dos bulbos de <i>Eleutherine plicata</i>	65
Tabela 3: Variação da evolução ponderal de camundongos, (machos e fêmeas) tratados com dose única de EEep (5000mg/kg), e observados durante 14 dias.	71
Tabela 4: Consumo de ração pelos camundongos (machos e fêmeas) tratados com dose única de EEep (5000mg/kg) e observados durante 14 dias.	72
Tabela 5: Variação da evolução ponderal dos camundongos tratados com EEep nas doses de 100 e 300 mg/kg .	73
Tabela 6: Variação do consumo de ração dos camundongos tratados com EEep nas doses de 100 e 300 mg/kg	73
Tabela 7: Variação do consumo de água dos camundongos tratados com EEep nas doses de 100 e 300 mg/kg .	74
Tabela 8: Parâmetros hematológicos de camundongo machos tratados com diferentes doses do EEep durante o ensaio de toxicidade subcrônica.	75
Tabela 9: Valores dos parâmetros oxidativos obtidos de cérebro e pulmões de animais controle, infectados e infectados e tratados com EEep na dose de 300 mg/Kg no ensaio de malária experimental murina.	84

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

μL	Microlitro
μM	Micromol
$^{\circ}\text{C}$	Grau Celsius
$^{\circ}\text{GL}$	Grau GayLussac
ABTS	2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-ácido-6-sulfônico-diamônio
Alt.	Altitude
ALT	Alanina Transaminase
AST	Aspartato Transaminase
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Cloreto de Cálcio diidratado
CD36	Antígeno de adesão leucocitária
CHCM	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
Cl^-	Íon cloreto
CL_{50}	Concentração letal média
Cm	Centímetro
cNOS	NOS Constitutiva
CO_2	Gás Carbônico
CSA	Condroitina sulfato
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Médium
ERTON	Espécies Reativas Tóxicas de Oxigênio e nitrogênio
EEEp	Extrato Etanólico de <i>Eleutherine plicata</i>
Fe^{+2}	Íon Ferroso
Fe^{+3}	Íon Férrico

Gama – GT	Gama Glutamil Transferase
GSH-Px	Glutathiona Peroxidase Selênio Dependente
GSSG	Glutathiona Oxidada
G	Grama
H ⁺	Hidrogênio
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média
HIV	Virus da Imunodeficiência Humana
ICAM-1	Molécula de adesão intracelular
IL-1	Interleucina um
IL-6	Interleucina seis
iNOS	NOS Induzível
K ⁺	Íon Potássio
KCl	Cloreto de Potássio
Kg	Quilograma
K ₂ S ₂ O ₈	Persulfato de Potássio
KOH	Hidroxido de Potássio
L	Litro
L-arg	L-arginina
Long.	Longitude
Lat.	Latitude
MCS-F	Fator estimulador de colônias de macrófagos
MDA	Malondialdeído
MTT	3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromida

MG	Miligrama
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
Min	Minuto
mL	Mililitro
Mm	Milimetro
Na ⁺	Ion Sódio
NaCl	Cloreto de Sódio
NADP ⁺	2-oxaldeído desidrogenase
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NaHCO ₃	Bicarbonato de Sódio
Na ₂ SO ₄	Sulfato de sódio
NH ₄ OH	Hidróxido de amônio
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintetase
NOS1	NOS Neuronal
NOS2	NOS Inflamatória
NOS3	NOS Endotelial
NO _x	Nitrítos e Nitratos
O ₂ ⁻	Radical superóxido
OECD	Organization for Economic Co-operation and Development
OH ⁻	Radical Hidroxila
OMS	Organização Mundial da Saúde
ONOO ⁻	Peroxinitrito
PF4	Fator plaquetário quatro

PfEMP1	Proteína um de membrana do eritrócito do <i>P. falciparum</i> .
pH	Potencial hidrogeniônico
ROO ⁻	Radical Peroxil
RPM	Rotações por minuto
SH	Grupo Tiol
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Siistema nervoso periférico
SOD	Superóxido dismutase
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
TEAC	Capacidade antioxidante equivalente ao Trolox
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
TNB	Ácido 5-tio-2-nitrobenzóico
TROLOX	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromono-2-carboxílico
UFRA	Universidade Federal Rural da Amazônia
UFPA	Universidade Federal do Pará
U.V.	Ultravioleta
VCM	Volume corpuscular médio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
1.1 MALÁRIA	22
1.2 ESTRESSE OXIDATIVO E SUA RELAÇÃO COM A MALÁRIA	26
1.3 O USO DE PLANTAS MEDICINAIS NA TERAPIA DA MALÁRIA	30
1.4 AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE DE PLANTAS E DROGAS VEGETAIS	33
1.5 <i>ELEUTHERINE PLICATA</i> HERB: CARACTERÍSTICAS GERAIS E ATIVIDADES BIOLÓGICAS	38
2 OBJETIVOS.....	44
2.1 OBJETIVO GERAL	44
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	44
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	46
3.1 MATERIAL BOTÂNICO	46
3.2 PROCESSAMENTO DO MATERIAL BOTÂNICO	47
3.3 PREPARAÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO DO BULBO DE <i>ELEUTHERINE PLICATA</i>	47
3.4 ENSAIOS FARMACOGNÓSTICOS DA DROGA VEGETAL	48
3.4.1 GRANULOMETRIA.....	48
3.4.2 DENSIDADE	48
3.4.3 TEOR DE CINZAS	49
3.4.4 DETERMINAÇÃO DO PH.....	49
3.5 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA DO EXTRATO ETANÓLICO DE <i>ELEUTHERINE PLICATA</i>	49
3.5.1 ALCALÓIDES.....	49
3.5.2 FLAVONÓIDES.....	50
3.5.3 TANINOS	50
3.5.4 SAPONINAS	50
3.5.5 ANTRAQUINONAS.....	50
3.5.6 ESTERÓIDES E TRITERPENÓIDES	51
3.5.7 CUMARINAS.....	51
3.5.8 QUINONAS	51
3.6 BIOENSAIO DE TOXICIDADE PRELIMINAR COM <i>ARTEMIA SALINA</i>	52
3.7 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE	53
3.8 TESTE DE TOXICIDADE ORAL AGUDA E SUBCRÔNICA.....	54
3.8.2 TOXICIDADE AGUDA ORAL	55
3.8.3 TOXICIDADE SUBCRÔNICA.....	56
3.9 AVALIAÇÃO DO EXTRATO SECO DE <i>E. PLICATA</i> SOBRE ALGUNS PARÂMETROS DO ESTRESSE OXIDATIVO NA MALÁRIA MURINA.....	58

3.9.1 PREPARAÇÃO DOS TECIDOS	59
3.9.2 PARASITEMIA	60
3.9.3 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL EQUIVALENTE AO TROLOX® (TEAC).....	60
3.9.4 DOSAGEM DO MALONDIALDEÍDO (MDA)	61
3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	61
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	64
4.1 GRANULOMETRIA, PH, DENSIDADE E TEOR DE CINZAS	64
4.2 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA	65
4.3 BIOENSAIO DE TOXICIDADE EM <i>ARTEMIA SALINA</i>	66
4.4 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE	68
4.5 TESTE DE TOXICIDADE ORAL AGUDA.....	70
4.6 TESTE DE TOXICIDADE ORAL SUBCRÔNICA.....	72
4.7 AVALIAÇÃO DO EXTRATO DE <i>E. PLICATA</i> EM MODELO DE MALÁRIA MURINA	82
5 CONCLUSÕES	92
6 REFERÊNCIAS	95
7.1 ANEXO I.....	109
7.2 ANEXO II.....	110

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 MALÁRIA

A malária, também conhecida como paludismo, maleita ou sezão, foi primeiramente citada por Hipócrates, durante a era pré-cristã, o qual descreveu suas características de ocorrência sazonal e de febre com padrão paroxístico e intermitente. A doença é uma parasitose, que pode apresentar manifestações agudas ou crônicas, causada por protozoários do gênero *Plasmodium*. Esta doença pode atingir pessoas de todas as idades e é transmitida pelas fêmeas dos mosquitos do gênero *Anopheles*, durante o repasto sanguíneo que realizam para o amadurecimento dos seus ovários. Além disso, a malária pode ser transmitida de forma induzida, através de transfusão sanguínea com sangue contaminado, ou com utilização de seringas com agulhas contaminadas (BRAGA, 2005; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

Existem cerca de 150 espécies de parasitas causadoras desta enfermidade em diferentes hospedeiros vertebrados, sendo cinco delas capazes de transmitir a doença em humanos: *Plasmodium vivax*, a espécie mais difundida pelo mundo, *P. malariae*, *P. ovale*, que ocorre apenas em regiões restritas do continente africano, *P. knowlesi* e *P. falciparum*, sendo este último capaz de desencadear as formas graves da doença: malária cerebral e pulmonar (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011, BRAGA, 2005; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

Mulheres grávidas, além de estarem em risco de desenvolver as formas severas, podem vir a apresentar aborto espontâneo, nascimento prematuro ou morte da criança ao nascer. A doença ainda é a causa da anemia materna severa, responsável por volta de um terço dos casos reversíveis de bebês que nascem abaixo do peso. (BRAGA, 2005; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010, 2011).

Quase metade da população mundial está em situação de risco de contrair a doença, levando ao surgimento de 300 a 500 milhões de novos casos e aproximadamente um milhão de mortes por ano. Na África, uma em cada quatro crianças morrem devido à doença e estima-se que a cada três segundos, uma morra de malária. Ainda, a enfermidade é a causa da morte de mais de 10 mil grávidas e por volta de 200 mil infantes no continente. No Brasil, 99% dos casos da enfermidade se

concentram na região amazônica, sendo esta considerada a região endêmica do país (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010).

O início da infecção ocorre quando a forma esporozoíta infectante do parasita é inoculada nos seres humanos pelo mosquito durante o repasto sanguíneo. Uma vez alcançada a corrente sanguínea, os esporozoítos migram pelo corpo até atingirem os hepatócitos, onde se inicia o processo de desenvolvimento parasitário, cerca de 30 minutos após a infecção. Após a invasão dos hepatócitos, os esporozoítos se diferenciam em trofozoítos pré-eritrocíticos, que multiplicam-se por reprodução assexuada do tipo esquizogonia, dando origem aos esquizontes teciduais e, posteriormente milhares de merozoítos que invadirão os eritrócitos. Esta primeira fase do ciclo é denominada **exo-eritrocítica**, **pré-eritrocítica** ou **tissular** e precede o ciclo sanguíneo do parasita (BRAGA, 2005; MINISTERIO DA SAÚDE, 2008).

Durante o repasto sanguíneo, a fêmea do mosquito ingere as formas sanguíneas do parasita, mas somente os gametócitos serão capazes de continuar a evolução no inseto. No intestino médio do mosquito, fatores como a temperatura e aumento pH estimulam o processo de gametogênese, no qual os gametócitos se transformam em gametas extracelulares em poucos minutos após a ingestão do sangue. O gametócito feminino torna-se o macrogameta e o gametócito masculino, por um processo denominado exflagelação, dá origem a oito microgametas. Em torno de 30 minutos, um macrogameta será fecundado por um microgameta, formando um ovo, ou zigoto e após 24 horas esse zigoto passa a movimentar-se por contrações do corpo, sendo denominado oocineto. Ao atingir a parede do intestino médio, este se encista na camada epitelial do órgão, passando a se chamar oocisto.

Tem início, então o processo de divisão esporogônica e, após um período que varia de 9 a 14 dias, ocorre a ruptura da parede do oocisto, liberando os esporozoítos formados durante o processo de esporogonia. Estes serão então disseminados pelo corpo do vetor até que atinjam as glândulas salivares. Com o repasto sanguíneo, estes esporozoítos serão injetados no hospedeiro vertebrado, reiniciando ciclo biológico, conforme descrito na Figura 1 (BRAGA, 2005).

tremores, suor, cefaléia, que ocorrem em padrões cíclicos e agudos, dependendo da espécie do parasito: 48 horas para *P. falciparum* e *P. vivax* - malária terça - e 72 horas para *P. malarie* - malária quarta (MINISTERIO DA SAÚDE, 2008).

Durante a fase eritrocítica do *P. falciparum*, os trofozoítos aumentam a viscosidade dos eritrócitos, por causarem modificações na superfície da célula parasitada que permitem a sua adesão à parede endotelial dos capilares (LUSE e MILLER, 1971). Este aumento da viscosidade das hemácias parece ser responsável pela obstrução de vasos sanguíneos, principalmente dos capilares renais (o que provoca a insuficiência renal aguda nos portadores da doença), dos capilares pulmonares (que pode provocar transudação alveolar) e dos capilares cerebrais (PHIRI et al., 2009).

Este fenômeno, denominado de citoaderência vascular, é mediado por proteínas do parasito expressas na superfície da célula vermelha infectada, tais como a proteína 1 de membrana do eritrócito do *P. falciparum* (PfEMP1). A expressão de tais proteínas permite que hemácias parasitadas se liguem a diferentes moléculas do hospedeiro localizadas no endotélio vascular, tais como a molécula de adesão intercelular tipo 1 (ICAM-1), a molécula de adesão a células endoteliais de plaquetas (PECAM), a molécula de adesão a células vasculares (VECAM), o ácido hialurônico, o sulfato de heparina e outras, interrompendo o fluxo sanguíneo e causando o comprometimento do órgão irrigado pelos vasos obstruídos (PETTERSSON et al., 2005).

A malária causada pelo *P. berghei* afeta roedores, e são modelos experimentais ideais para o estudo da malária, para orientação de possíveis estudos com pacientes. Os animais infectados pelo *P. berghei* apresentam um quadro clínico semelhante à infecção pelo *P. falciparum*, e, com muita frequência, o hospedeiro pode ter danos de órgãos, como pulmões, cérebro, fígado e baço, complicações semelhantes àquelas que ocorrem na malária grave.

Nesse sentido, entre as complicações graves causadas pelo *P. falciparum*, se destaca o comprometimento pulmonar, caracterizado, principalmente pela presença de edema pulmonar agudo que se desenvolve em cerca de um terço dos casos fatais de malária; e a malária cerebral, que é a manifestação mais grave. (BRAGA, 2005).

Os principais sintomas da malária cerebral são: forte cefaléia, hipertermia, vômitos, sonolência e convulsões (principalmente em crianças).

Existem duas grandes teorias para explicar a patogênese da malária cerebral humana. A teoria da obstrução mecânica sugere que a malária cerebral é consequência

direta do seqüestro dos eritrócitos, que acarreta obstrução do fluxo cerebral e conseqüente hipóxia cerebral (BERENDT et al., 1994). Por outro lado, a teoria da inflamação sugere que a malária cerebral é resultado de uma resposta imune exacerbada, na qual citocinas, especialmente o fator de necrose tumoral α (TNF- α), o interferon γ (IFN- γ) e interleucina 12 (IL-12), apresentam papel central no processo (CLARK e ROCKETT, 1994). O mérito relativo destas duas teorias tem sido extensivamente debatido, com um consenso em considerar uma hipótese conciliatória (JOHN et al., 2008), onde, malária cerebral resulte da integração de ambos os fatores.

As alterações oxidativas estão cada vez mais relacionadas com o *Plasmodium*, pois o parasita é altamente suscetível à essas variações, que podem estar envolvidas nas complicações da doença, tal como a malária cerebral, acidose metabólica e edema pulmonar agudo (BERENDT et al., 1994; CLARK e ROCKETT, 1994, VAN DER HEYDE et al., 2006; BECKER et al., 2004; PINO et al., 2003). É demonstrado também que o *P. falciparum* dispõe de um vasto sistema de defesas antioxidantes para se proteger das variações que ocorrem no interior dos eritrócitos (MÜLLER, 2004).

Devido a todas estas características fisiopatogênicas das espécies de plasmódio mencionadas, o entendimento da doença ainda não está completo. Buscando esclarecimentos sobre os mecanismos bioquímicos da doença, diversos autores discutem o envolvimento dos radicais livres, através do estresse oxidativo.

1.2 ESTRESSE OXIDATIVO E SUA RELAÇÃO COM A MALÁRIA

Segundo Percário (2000), o estresse oxidativo consiste no desequilíbrio entre a defesa antioxidante do organismo e a produção de radicais livres do mesmo, podendo ocorrer de duas maneiras: através da produção excessiva de radicais livres ou através da diminuição da atividade antioxidante fisiológica.

Os radicais livres são espécies químicas cuja última camada eletrônica não se encontra pareada, que tem meia-vida muito curta, alguns na ordem de 10^{-27} s, que são altamente reativos e que apresentam vida livre. Uma molécula qualquer pode tornar-se um radical livre tanto ganhando como perdendo um elétron numa reação química, ou quando ocorre quebra homogênea da ligação química (PERCÁRIO, 2008).

Várias moléculas não se encaixem na definição química de radical livre, mas apresentam relevância devido à importância que elas têm no equilíbrio oxidativo e toxicidade no organismo. Elas são conhecidas como espécies reativas tóxicas derivadas do oxigênio e nitrogênio (ERTON) sendo as principais o óxido nítrico (NO), o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o radical peroxil (ROO^{\cdot}), o radical hidroxila (OH^{\cdot}) e o peróxido de hidrogênio, H_2O_2 (FELLIPE e PERCÁRIO, 1991; PERCÁRIO, 2008). O organismo, para se defender da agressão causada pelos radicais livres, dispõe de um sistema de defesa antioxidante, que pode ser didaticamente dividido em três tipos (FELLIPE e PERCÁRIO, 1991; PERCÁRIO, 2000): primeiramente o sistema antioxidante enzimático, composto principalmente por três tipos de enzimas, a superóxido dismutase, SOD (Figura 2), a glutathiona peroxidase selênio dependente (GSH-Px) demonstrada na Figura 3 e, por fim a catalase (Figura 4). Além deste sistema, também existe o sistema antioxidante de moléculas pequenas, constituído por moléculas como a vitamina C e o betacaroteno, por exemplo, as quais reagem diretamente com radicais livres e diminuem sua reatividade. Por fim, existe o sistema antioxidante de proteínas queladores de metais, as quais se ligam a metais de transição que catalisam reações produtoras de radicais livres no organismo, como as reações de Fenton e Haber-Weiss (Figuras 5 e 6)

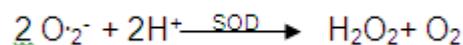


Figura 2: Reação catalisada pela SOD

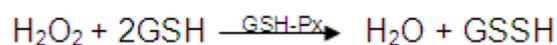


Figura 3: Reação catalisada pela GSH-Px

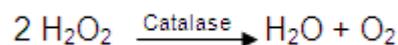


Figura 4: Reação catalisada pela Catalase

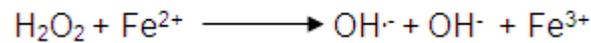


Figura 5: Reação de Fenton

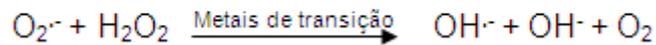


Figura 6: Reação de Haber-Weiss

Vários estudos afirmam que, em resposta à infecção causada pelos plasmódios, manifestam-se os mecanismos de defesa do hospedeiro, nos quais as ERTON, incluindo o NO, superóxido e peroxinitrito (ONOO^\cdot) são capazes de matar os parasitas da malária no estágio eritrocitário, constituindo-se em importante arma de defesa frente à infecção (FELLIPE & PERCÁRIO, 1991; CLARK & COWDEN, 2003; BECKER et al., 2004).

Durante a infecção pelas diferentes espécies de *Plasmodium* o estresse oxidativo é induzido pelas ERTON, tanto no meio extracelular quanto no meio intracelular. No meio intracelular, os radicais livres são produzidos principalmente como resultado da oxidação e degradação da hemoglobina, digerida no meio ácido do vacúolo alimentar do parasita. Isto ocorre devido a presença do ferro presente no grupo heme, que nesta organela sofre oxidação espontânea do íon ferroso (Fe^{+2}) para a forma de íon férrico (Fe^{3+}).

No vacúolo também ocorre a formação de O_2^\cdot . Esta combinação leva a formação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e, conseqüentemente, à geração de radicais hidroxila, ambos altamente reativos. Além disso, a acidificação do lisato em hemácias infectadas com *P. falciparum* (a qual ocorre durante a digestão do citosol da célula hospedeira no vacúolo alimentar no parasita) resulta na produção de H_2O_2 (BALLA et al., 2003; MÜLLER, 2004; POSTMA et al., 1996).

No meio extra-eritrocítico também é verificado um aumento da produção de radicais livres. As formas merozoítas e os antígenos solúveis do parasita tem a capacidade de induzir a produção de ERTON de monócitos e neutrófilos no hospedeiro. Durante a infecção por *P. falciparum*, há um aumento da produção de ERTON por

células fagocíticas, e esta produção é maior em casos complicados de malária (POSTMA et al., 1996).

Juntamente com isto, o nível de peroxidação lipídica se encontra elevado em pacientes infectados pelo *P. vivax*, mesmo em portadores não graves da doença (PABLÓN et al., 2002). Este fenômeno se inicia pela reação de um ácido graxo insaturado com algum lipídio e é propagada por radicais hidroxilas, num processo que causa rearranjos nas cadeias lipídicas, formação de novos radicais livres e consequente propagação do dano causado, o que pode se tornar algo grave se a reação ocorrer em lipídios de membrana, pois isso pode comprometer a estrutura e função de membrana plasmática. Esta cadeia de reações (Figura 7) tem como resultado a formação de hidroperóxidos lipídicos e compostos aldeídicos (FELLIPE e PERCÁRIO, 1991).

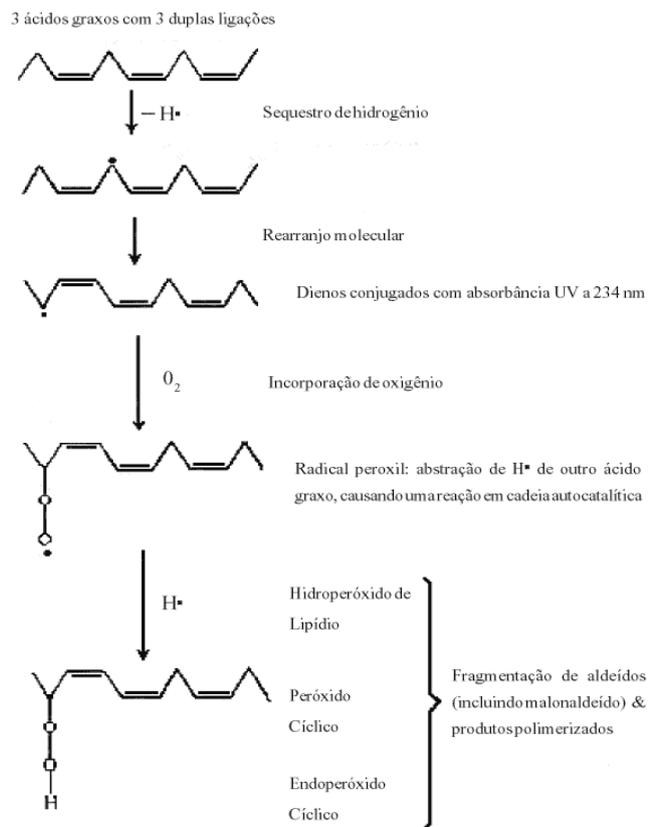


Figura 7: Peroxidação lipídica. Fonte: MAFRA et al. (1999)

1.3 O USO DE PLANTAS MEDICINAIS NA TERAPIA DA MALÁRIA

O tratamento para malária humana visa, principalmente, interromper a esquizogonia sanguínea, que é a causa da patogênese e dos sintomas clínicos da doença. O tratamento oral previne a progressão da doença para estados severos, ou seja, se as drogas forem administradas corretamente, ocorre a diminuição da morbidade e mortalidade causada pela doença (OLIVEIRA et al., 2009).

Para que uma substância de origem vegetal de fato se torne uma droga antimalárica, sugere-se que sejam seguidos alguns critérios de seleção para as substâncias candidatas (WRIGHT, 2010):

- As substâncias devem apresentar atividade antiplasmódica potente, tanto em cepas de *P.falciparum* resistentes, como em não resistentes à cloroquina;
- Devem ser seletivamente tóxicas aos parasitas da malária;
- Devem erradicar parasitas da malária em camundongos, sem apresentar toxicidade;
- Devem ser ativos quando utilizados por via oral.

A primeira droga antimalárica foi a quinina, uma substância isolada pela primeira vez em 1820 da casca de *Chinchona spp.* A estrutura da quinina (Figura 8) foi estabelecida pela primeira vez por Rabe em 1908, e sua síntese foi concluída em 1944 por Woodward e Doering, porém, sua produção em escala industrial mostrou ser muito onerosa, o que restringiu seu uso. A quinina é atualmente isolada de árvores *Chinchona spp.* que crescem na América do Sul (OLIVEIRA et al., 2009).

A Cloroquina (Figura 9) foi sintetizada a partir da quinina, e, até pouco tempo atrás, foi uma das únicas drogas disponíveis para o combate à malária. Porém, nos últimos trinta anos a situação se agravou com a multiplicação das cepas de *Plasmodium falciparum* resistentes à cloroquina, o que causou o aumento na mortalidade, principalmente nos países do continente africano (OLIVEIRA et al., 2009).

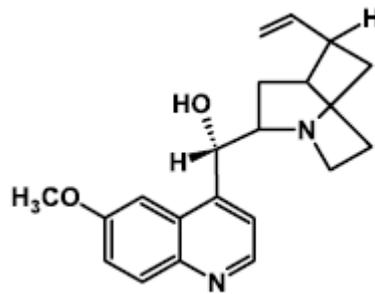


Figura 8: Estrutura química da Quinina. Fonte: OLIVEIRA et al. (2009).

Apesar dos esforços para a produção de novas drogas antimaláricas sintéticas, a contribuição mais relevante que ocorreu recentemente foram as pesquisas com plantas medicinais que contêm artemisinina (Figura 10). Esta substância foi isolada em 1972 da *Artemia annual*, uma espécie de uso tradicional da China. Os derivados semi-sintéticos desse composto vêm sendo usados de maneira crescente. Embora sejam efetivos contra *P. falciparum* resistentes à cloroquina, o tratamento combinado com outra droga é recomendado, a fim de se evitar o desenvolvimento de resistência (OLIVEIRA et al., 2009). Infelizmente, já existem indícios de cepas resistentes ao tratamento baseado na terapia com artemisinina e derivados dela no oeste do Camboja (WHITE, 2008).

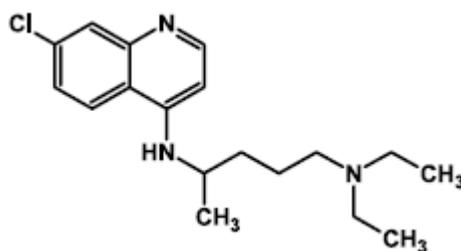


Figura 9: Estrutura química da Cloroquina. Fonte: OLIVEIRA et al. (2009)

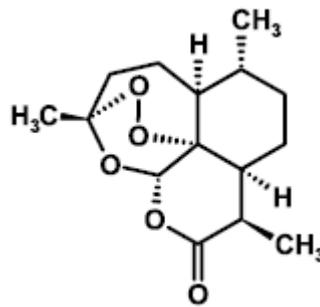


Figura 10: Estrutura química da Artemisinina. Fonte: OLIVEIRA et al. (2009)

A mais nova droga antimalárica é a atovacona, um composto análogo ao lapachol, que é uma fenilnaftoquinona oriunda da espécie *Tabebuia*. Quando usada em combinação com proguanil, esta substância é efetiva contra a malária. Porém, por ter um alto custo, este medicamento não é utilizado em larga escala em muitos países endêmicos (OLIVEIRA et al, 2009).

A resistência à quimioterapia é um dos maiores problemas no controle da doença. Ela se deve ao princípio da evolução das espécies, onde a presença de fármacos pode servir como processo de seleção natural dos parasitas resistentes dentro do hospedeiro. A resistência tem maior probabilidade de ocorrer quando o número de parasitas em um indivíduo é alto, a transmissão é baixa e a pressão do fármaco é intensa, em um nível sub-terapêutico. A utilização de um único fármaco no tratamento ocasiona uma seleção e espalhamento de parasitas mutantes resistentes ao fármaco. Em longo prazo, o uso de múltiplos fármacos leva ao aparecimento de cepas de parasitas multi-resistentes (FRANÇA et al., 2008).

Além do aspecto da resistência, a própria toxicidade dos fármacos utilizados na terapêutica também limita os seus usos. Por estas razões, é premente a necessidade de busca de novas e mais eficazes alternativas terapêuticas, promovendo a cura em tempo razoável para garantir adesão ao tratamento, e que sejam seguras e de baixo custo (FIDOCK et al., 2004; LEE et al., 2007; MOHAMAD et al., 2009). Neste aspecto, as plantas têm dado importante contribuição e produtos isolados a partir do extrato destas fontes naturais continuam a representar uma importante fonte para a obtenção de protótipos candidatos a novos fármacos antimaláricos (BIOT e CHIBALE., 2006).

1.4 AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE DE PLANTAS E DROGAS VEGETAIS

Embora os produtos naturais tenham amplos espectros terapêuticos e baixa incidência de efeitos colaterais, não são considerados como substâncias inócuas, sendo necessária a realização de ensaios toxicológicos para fornecer a comunidade dados científicos sobre segurança do uso destes produtos (ASSEMI, 2001).

A toxicologia é a ciência responsável pelo estudo os eventos envolvidos nas intoxicações, desde a prevenção da ocorrência de efeitos tóxicos até a recuperação de um paciente acometido pelos mesmos (SÁ, 2008).

O uso de plantas medicinais sob várias formas de apresentação é bastante comum em várias camadas da população brasileira. Tal hábito parte do pressuposto de que as plantas medicinais, além de possuírem atividade terapêutica, são desprovidas de efeitos tóxicos. Este aspecto é importante se considerarmos que o conhecimento sobre plantas medicinais é de domínio popular e, em países em desenvolvimento, contém um forte componente social e cultural, pois estas plantas muitas vezes representam o único recurso terapêutico de muitas comunidades (ALVES, 2007).

O estudo toxicológico das plantas medicinais e drogas vegetais é alvo de investigações de muitos estudiosos desde antigas civilizações. Por mais que tenham um potencial curativo e/ou preventivo, as plantas medicinais possuem substâncias que, dependendo da dose, podem ser tóxicas ao organismo, causando reações indesejáveis ou até mesmo levar a óbito. Uma mesma planta pode conter partes medicinais e terapêuticas e também partes com substâncias tóxicas prejudiciais ao organismo humano e animal. Com o avanço da indústria farmacêutica mundial, a farmacologia e a toxicidade dos componentes químicos das plantas são elucidadas dia a dia, de modo a estabelecer as doses terapêuticas e tóxicas de forma precisa e conhecer as possíveis interações com outros fármacos, o que garante o promissor uso mundial dos fitoterápicos, em uma medicina consciente e eficaz (OGA, 1996; BEDNARCZUK et al., 2010).

Atualmente, houve um aumento perceptível dos programas de fitoterapia apoiados pelo Serviço Público de Saúde (ALVES, 2006). Estudos vêm mostrando que, apesar da crescente importância dos fitoterápicos atualmente, poucos trabalhos foram feitos para atestar a segurança dos mesmos, sendo que muitos são utilizados com base em informações etnofarmacológicas (TUROLLA e NASCIMENTO, 2006). É conveniente

lembrar que testes de confirmação de toxicidade, adulteração de produto, interações medicamentosas e efeitos adversos também podem ser feitos com medicamentos de origem natural e que a realização de testes farmacológicos nas drogas vegetais é uma importante ajuda no desenvolvimento de conhecimento científico e aprimoramento da medicina tradicional, uma vez que os resultados sejam retornados a população (VEIGA e ANGELO, 2005; SIXEL e PECINALLI, 2005; LIMA, 2007).

A toxicologia experimental colabora com a validação do uso de uma planta medicinal porque desenvolve estudos para elucidação dos mecanismos de ação dos agentes tóxicos sobre sistemas biológicos e a avaliação dos efeitos decorrentes dessa ação (OGA, 1996).

Os estudos toxicológicos, aplicados em animais de laboratório e sob condições previamente estabelecidas, permitem determinar os possíveis efeitos de substâncias em humanos, a partir da extrapolação dos resultados obtidos nestes estudos (BARROS e DAVINO, 2003). Neste caso, os resultados de exames hematológicos e bioquímicos, a autópsia geral, a histopatologia e a manutenção do grupo controle para fins de comparação devem ser realizados, bem como a avaliação do estado geral dos animais e a observação dos efeitos tóxicos (LIMA et al., 2003).

Todavia, o número de animais usados em pesquisas é algo cada vez mais discutido, principalmente pelo caráter ético, em relação ao grande número e ao sofrimento causados a esses em pesquisas. (REPETO e REPETO, 1995).

Para este fim, alguns testes toxicológicos preliminares são realizados com o intuito de se pesquisar a atividade de produtos naturais de maneira mais rápida e sem a necessidade de animais de experimentação, que cada vez mais estão sendo submetidos a um controle rigoroso de aceitação. Estes são os chamados testes toxicológicos *in vitro* (ROGERO et al., 2003).

Os métodos *in vitro* apresentam vantagens em relação aos *in vivo* tais como poder limitar o número de variáveis experimentais, obter dados significativos mais facilmente além do período de teste ser, em muitos casos, mais curto. O problema da extrapolação dos dados obtidos *in vitro* para a aplicação clínica dos biomateriais pode ser superado pelo uso de materiais de referência apropriados, atualmente em uso em clínicas (ROGERO et al., 2003).

Esses métodos alternativos *in vitro*, compreendem a utilização de organismos como bactérias, fungos, algas, crustáceos e também suspensões celulares e cultivo de tecidos, para que substitua ou sirvam como prévia para um estudo toxicológico *in vivo*,

melhorando a sensibilidade e especificidade de testes com animais (BEDNARCZUK, 2010).

Um teste bastante utilizado para avaliação preliminar de toxicidade de extratos vegetais é o bioensaio em *Artemia salina* Leach, um microcrustáceo de da ordem Anostraca (sem carapaça), que habita lagos de água salgada e salinas de todo o mundo, e que é utilizado na alimentação de peixes e camarões por seu alto valor nutritivo (ANDRIOLLI et al., 2007). Os cistos não eclodidos são metabolicamente inativos e podem ser conservados por longos períodos se mantidos desidratados e de preferência em vácuo e a baixas temperaturas (VEIGA, 1989). Quando reidratados, os cistos de *A. salina* eclodem em cerca de 20 horas, em condições ambientais adequadas, chegando à fase adulta com 20 a 30 dias de vida (RIBEIRO, 2010).

Esses cistos são eclodidos a partir do rompimento da membrana através da combinação de luz, oxigênio e umidade, liberando a larva (náuplio) para nadar ativamente. Durante as primeiras 24 horas, o náuplio consome o vitelo (camada que envolve seu corpo) como fonte de alimento e, por esta razão, o processo de alimentação por filtração não ocorre, permitindo que o organismo encontre-se mais protegido da presença de possíveis contaminantes presentes no meio (SORGELOS et al., 1978). Portanto, as fases preferidas para a realização dos testes toxicológicos são metanáuplio (preferencialmente as fases de metanauplio II e III) verificadas após 24 horas de eclosão dos náuplios, uma vez que, nestas fases, os organismos já iniciaram a atividade de filtração, possibilitando o contato do epitélio do trato digestivo com o meio externo, estando, portanto mais sensíveis, diminuindo assim a variabilidade do teste. (SORGELOS et al., 1978).

O bioensaio com *A. salina* tem demonstrado resultados confiáveis além de uma boa correlação com várias atividades biológicas, sendo bastante conveniente como método para o monitoramento de produtos naturais bioativos (MEYER et al., 1982), apresentando também uma boa correlação com atividade citotóxica em certos tumores humanos sólidos, sugerindo que tal teste pode ser empregado como uma primeira análise do potencial citotóxico de novos compostos (MCLAUGHLIN et al., 1998).

Outro modelo de avaliação de toxicidade que vem ganhando força entre os estudiosos da área é o de citotoxicidade. Este se utiliza de células de mamíferos e avalia os danos causados as células, a formação ou não de colônias celulares, ou a viabilidade das mesmas. O uso de culturas celulares, tem se tornado um modelo muito

aplicado, devido à sua reprodutibilidade, sensibilidade e rapidez (BEDNARCZUK et al., 2010).

A citotoxicidade basal é definida como os efeitos adversos resultantes da interferência com estrutura e/ou processos celulares essenciais para a sobrevivência, proliferação e/ou função comum a todas as células do organismo. A avaliação da citotoxicidade é importante, uma vez que as funções celulares básicas suportam as funções celulares órgãos-específicas. Ela é expressa como CL₅₀ (concentração letal a 50% das células quando comparado às células controle não-tratadas), a qual pode ser matematicamente calculada a partir da curva de concentração-efeito (OGA, 1996).

As metodologias que utilizam tecidos e células vivas são as mais empregadas, pois a intrínseca complexidade celular é mantida. As células utilizadas podem ser de vários tecidos, tanto de origem humana quanto animal, sendo que a sobrevivência e ou proliferação celular podem ser avaliadas por contagem do número de células ou pelo uso de corantes vitais (ROGERO et al., 2003).

Vários métodos aplicados para testar a toxicidade geral são úteis na toxicologia *in vitro*. Como regra geral, as células são expostas a diferentes concentrações de um produto químico por um dado período de tempo, sendo posteriormente a função celular mensurada utilizando diferentes alvos.

Mosmann (1983) descreveu uma técnica para quantidades elevadas de amostras, onde as células são semeadas em microplacas e a viabilidade celular é avaliada por métodos colorimétricos, utilizando a redução do MTT, brometo de [3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5- difeniltetrazólio], um sal de tetrazólio, de cor amarelada, que é reduzido por enzimas redutases mitocondriais de células metabolicamente ativas em cristais azuis de formazana que são solubilizados e posteriormente analisados por espectrofotometria UV/visível. Assim, quanto menor for a viabilidade celular, menor será a redução do MTT e menor o sinal espectrofotométrico. Esta técnica é rápida e quantitativa, pois permite avaliar várias concentrações do produto e calcular a concentração que causa 50 % de morte celular.

Durante o processo de desenvolvimento de novos medicamentos é necessária a realização de estudos pré-clínicos que consiste de testes em animais de laboratório, como ratos e camundongos, e uma fase clínica, quando os medicamentos são testados nos seres humanos. A fase pré-clínica tem por objetivo principal o fornecimento de informações sobre a farmacologia e toxicologia da substância em questão para que

assim possam ser realizados estudos clínicos com uma margem de segurança razoável e pré-estabelecida, baseada nos resultados obtidos. (PIVETTA, 2004; SÁ, 2008).

Os efeitos tóxicos observados no homem tendem a se encontrar, na mesma faixa de concentração daqueles dos animais de laboratório. Além disso, a exposição de animais a agentes tóxicos em doses elevadas é um método necessário e válido para a descoberta de possíveis perigos para a espécie humana que é exposta a doses muito menores (KLAASSEN, 2006; BARROS e DAVINO, 2003). Desse modo, são utilizados, dentre outros, testes de toxicidade aguda e subcrônica em animais.

A avaliação toxicológica de produtos em organismos vivos pode envolver a avaliação dos efeitos obtidos após 24 horas da administração (toxicidade aguda) ou após administrações em doses repetidas (toxicidade subcrônica e crônica). Outros estudos como toxicidade reprodutiva; estudos de efeitos neurotóxicos e/ou teratogênicos e estudos de efeitos carcinogênicos e/ou mutagênicos podem fazer parte de uma avaliação mais detalhada dos efeitos da administração de fitoterápicos em animais (VASCONCELOS, 2004).

Por definição, a toxicidade aguda avalia o efeito nefasto produzido dentro de um curto período de tempo e que resulta da administração de uma dose única. Neste contexto, a avaliação da toxicidade aguda fornece uma estimativa das propriedades tóxicas de uma substância, visando dar subsídios a cerca dos riscos à saúde resultantes de uma exposição de curta duração e servir de alicerce para estabelecer um regime posológico para pesquisas sobre toxicidade crônica (BRITO, 1994).

A avaliação de toxicidade aguda tem por objetivo caracterizar a relação dose/resposta que conduz ao cálculo da DL_{50} (dose letal mediana). Este parâmetro é útil para se identificar a toxicidade relativa da substância frente a uma população de animais de experimentação. Além da letalidade, outros parâmetros são investigados em estudos de toxicidade aguda como o potencial tóxico em órgãos específicos, indicativos sobre a toxicocinética e mecanismos de ação, estabelecimento das doses para estudos complementares de toxicidade, entre outros (VALADARES, 2006).

No entanto, depois de anos de debates, o teste de DL_{50} foi banido das diretrizes que norteiam a avaliação de toxicidade aguda (BOTHAM, 2003). Hoje, são empregados três métodos alternativos em animais que trouxeram uma significativa melhora do bem-estar dos mesmos.

O teste de toxicidade aguda por dose fixa, preconizado pela Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD), é um destes métodos alternativos,

que avalia a toxicidade aguda oral, na qual se evita utilizar a morte dos animais como critério final para a avaliação e propõe a observação do aparecimento de sinais de toxicidade decorrentes da exposição a uma série de doses fixas, permitindo, desta forma, classificar as substâncias testadas de maneira compatível com o sistema empregado pela União Europeia, o qual qualificava pelos valores de DL_{50} oriundos do teste clássico de toxicidade aguda (OECD 420, 2001; VALADARES, 2006).

Um estudo internacional (VAN DEN HEUVEL et al., 1990) avaliou o Teste de Dose Fixa, e verificou-se que este procedimento, apesar de usar muito menos animais do que o DL_{50} produzia resultados compatíveis entre os diferentes laboratórios e provia informações adequadas sobre a toxicidade das substâncias, permitindo produzir categorias de toxicidade compatíveis com os fornecidos pelo método DL_{50} .

A toxicidade subcrônica e crônica diz respeito ao efeito nocivo que é produzido no animal resultante da administração repetida e diária da substância, considerando-se o aumento de suas concentrações ou de seus metabólitos, sobre tecidos sensíveis.

Os testes de toxicidade subcrônica geralmente seguem o procedimento adotado pela OECD 407, na qual o estudo dura pelo menos 30 dias, sendo que um grupo satélite é tratado por igual período de tempo e observado durante 14 dias sem tratamento, para verificar a reversibilidade dos efeitos (OECD 407, 2008).

1.5 *ELEUTHERINE PLICATA* HERB: CARACTERÍSTICAS GERAIS E ATIVIDADES BIOLÓGICAS

Eleutherine plicata Herb é um vegetal herbáceo, rizomático, bulboso, de bulbos avermelhados, semelhantes a uma cebola. Apresenta-se sob a forma de touceira com folhas inteiras, verticiladas, linear-lanecoladas, plissadas, com nervuras longitudinais, inflorescência em panículas de flores rosas ou brancas, no ápice de um escapo (Figura 11). É conhecida popularmente como marupazinho, marupari, palmeirinha, marupa-ú, coquinho, nambu-tutano, marupá-piranga e pertence à família Iridaceae. (LORENZI e MATOS, 2002)



Figura 11: *Eleutherine plicata* Herb.

Plantas do gênero *Eleutherine* são ricas em compostos naftoquinônicos e derivados, como os representados nas Figuras 12-14. As naftoquinonas são um grupo conhecido por serem capazes de induzir o estresse oxidativo (ALVES et al., 2003; HARA et al., 1997; MALHEIROS, 2008; PARAMAPOJN et al., 2008). Destas, vários compostos demonstraram ter a capacidade de induzir a formação de ERTON e causam a depleção da glutathiona celular (KLAUS et al., 2010), enquanto outros, por induzirem a formação de ERTON, aumentando, em resposta, os níveis de glutathiona celular. (SHI et al., 1994).

Foi realizado um estudo também com benzo[a]fenazinas sintetizadas a partir de naftoquinonas conhecidas: 1,2-naftoquinona, lapachol, β -lapachona, os quais foram testadas contra *Plasmodium falciparum* em experimento *in vitro* com parasitas que apresentavam susceptibilidade à cloroquina e à mefloquina. Das sete benzofenazinas testadas, quatro tiveram atividades significantes, sendo os parasitas resistentes à cloroquina mais susceptíveis as benzofenazinas ativas. Os dois compostos mais ativos foram testados também contra *Plasmodium berguei* em modelo animal utilizando camundongos. A fenazina 3-ácido sulfônico- β -lapachona foi muito ativa, causando 98% de inibição da parasitemia.

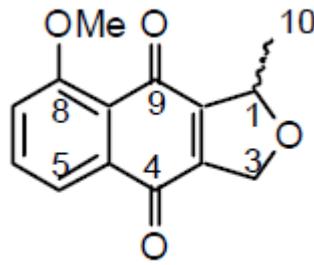


Figura 12: Estrutura química da eleuteriona. Fonte: Alves et al. (2003)

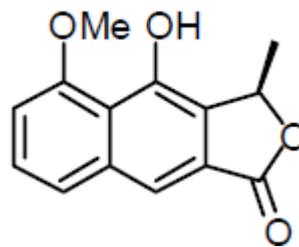


Figura 13: Estrutura química do eleuterol. Fonte: Alves et al. (2003)

Apesar de as naftoquinonas serem conhecidamente indutoras de estresse oxidativo, alguns trabalhos revelam que compostos presentes em plantas do gênero *Eleutherine* apresentam atividade antioxidante relacionada com o NO. Song et al. (2009) mostram que a (-)-isoeleuterina, um dos constituintes presentes na planta *Eleutherine americana*, apresentou efeito inibitório da síntese de óxido nítrico através da supressão da enzima óxido nítrico sintetase induzida, estimulada por lipopolissacarídeos, de maneira dose dependente. Esta inibição parece estar relacionada com a reação do fator de transcrição NF-κB (fator nuclear kappa beta). Em outro estudo, Han et al. (2008) demonstraram que, além da própria (-)-isoeleuterina, a (+)-isoeleuterina, (+)-hongconina, (+)-dihidroeleuterinol, e eleuterinol também exibiram atividade inibitória da produção de NO em macrófagos ativado por lipoplissacarídeos, apresentando resultados melhores que o padrão utilizado nos camundongos durante seu estudo. Neste mesmo estudo foi comprovado que os compostos não apresentaram citotoxicidade nas concentrações testadas.

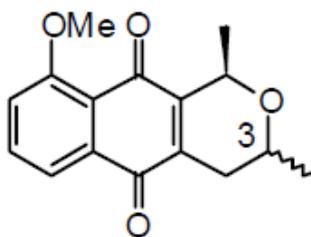


Figura 14: Estrutura química da eleuterina. Fonte: Alves et al (2003)

Malheiros (2008) verificou a presença das seguintes classes de metabólitos no extrato etanólico feito a partir dos bulbos secos da espécie *Eleutherine plicata*: esteróides, triterpenóides, açúcares redutores, antraquinonas e naftoquinonas. No mesmo estudo, com a fração obtida com acetato de etila, também foram encontrados saponinas, fenóis, taninos e derivados da cumarina. Ao ser realizada a cromatografia em camada delgada, foi detectada a presença de naftoquinonas no extrato etanólico e nas frações obtidas pelo autor.

Hara et al. (1997), relataram que foram isoladas as naftoquinonas elecanacina, eleuterina e isoeleuterina e o naftaleno isoeleuterol juntamente com do bulbo de *Eleutherine americana*. As estruturas foram determinadas por métodos de espectroscopia. No mesmo estudo eles verificaram que eleuterina possui atividade inibitória da topoisomerase 2 e isoeleuterina e isoeleuterol apresentaram atividade inibitória contra o Virus da Imunodeficiência Humana (HIV).

Paramapojn et al. (2008) isolaram uma nova naftopirona, denominada de eleuterinosídeo A, proveniente de uma amostra de *Eleutherine americana*, juntamente com compostos já conhecidos, que foram previamente isolados da mesma planta: isoeleuterina, eleuterol e eleutósido B. Neste estudo foi verificado que eleuterol está em maior concentração no vegetal que os demais compostos.

Este gênero da família Iridaceae também é conhecido por possuir, atividade biológica quimioterápica contra bactérias e fungos. Foi constatado por Limsuwan e Voravithikunchai (2008) que *Eleutherine americana*, juntamente com outras duas espécies, apresentou atividade contra a produção de biofilme da bactéria *Streptococcus pyogenes*, a qual utiliza este mecanismo como forma de resistência à tratamentos.

O extrato etanólico desta mesma espécie apresentou também atividade contra *Staphylococcus aureus* resistentes a metilicina. Quando as células de *S. aureus* foram

observadas em microscópio, foi revelado que houve dano na morfologia da membrana das bactérias (IFESAN et al., 2009).

Alguns de seus constituintes apresentaram baixa atividade antifúngica contra o crescimento de *Pyricularia oryzae*, além de um dos compostos (6,8-dihidroxi-3,4-dimetoxi-1-metil-antraquinona-2-ácido carboxílico metil ester) inibir a proliferação da linhagem celular K562 de eritroleucemia humana (JINZHONG et al., 2006) e a naftoquinona eleuterina, em outro estudo, apresentou atividade antidermatofita, agindo contra *Tricophyton mentagrophytes*, mostrando também atividade antimelanogênica (KUSUMA et al., 2010).

Em outro estudo, o extrato diclorometânico preparado dos bulbos de *Eleutherine bulbosa* (Miller) Urban apresentou atividade antifúngica em teste com *Cladosporium sphaerospermum*, um fungo patogênico para algumas plantas. Deste extrato foram as naftoquinonas eleuterina, eleuterina, isoeleuterina além de composto eleuterol. Todos os compostos quinônicos obtidos a partir deste extrato demonstraram forte atividade antifúngica contra *Cladosporium sphaerospermum*, sendo apenas o eleuterol inativo (ALVES et al., 2003). Brasileiro et al. (2006) constataram que *Eleutherine bulbosa* também possui atividade contra *Staphylococcus aureus*.

Levantamentos bibliográficos, inclusive, através do Banco de Dados da Universidade Illinois, Chicago, denominado “*Natural Products Alert*” (www.napralert.org) demonstraram a ausência de dados sobre possíveis efeitos tóxicos acerca da espécie *Eleutherine plicata* é desconhecida. Além disso, devido a sua composição química já demonstrada, bem como o de outras plantas do mesmo gênero, assim como o possível envolvimento de seus constituintes com mecanismos presentes nas variações oxidativas, e, conseqüentemente, influenciar na resolução da malária, pode-se considerar relevante à realização de estudos que avaliem os possíveis efeitos tóxicos e terapêuticos que o extrato alcoólico da planta possa apresentar.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi realizar uma avaliação da toxicidade do extrato etanólico seco dos bulbos de *Eleutherine plicata* (EEEp), bem como analisar seus efeitos sobre algumas alterações oxidativas em modelo de malária murina.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar ensaios de caracterização físico-química e abordagem fitoquímica do pó e extato de *E. plicata*;
- Determinar a toxicidade preliminar (CL₅₀) do EEEp em metanauplios do microcrustáceo *Artemia salina*;
- Determinar a citotoxicidade do EEEp em células HepG2 A16;
- Avaliar a toxicidade aguda oral do EEEp em camundongos Swiss machos e fêmeas;
- Avaliar a toxicidade subcrônica do EEEp em camundongos Swiss machos, dando subsídio à escolha da dose a ser empregada no modelo de malária experimental in vivo;
- Avaliar o efeito da administração do EEEp em algumas alterações oxidativas em camundongos infectados com o *Plasmodium berghei* ANKA (malária murina).

Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

De maneira resumida, os procedimentos experimentais foram desenvolvidos de acordo com o resumo esquemático apresentado na Figura 15.

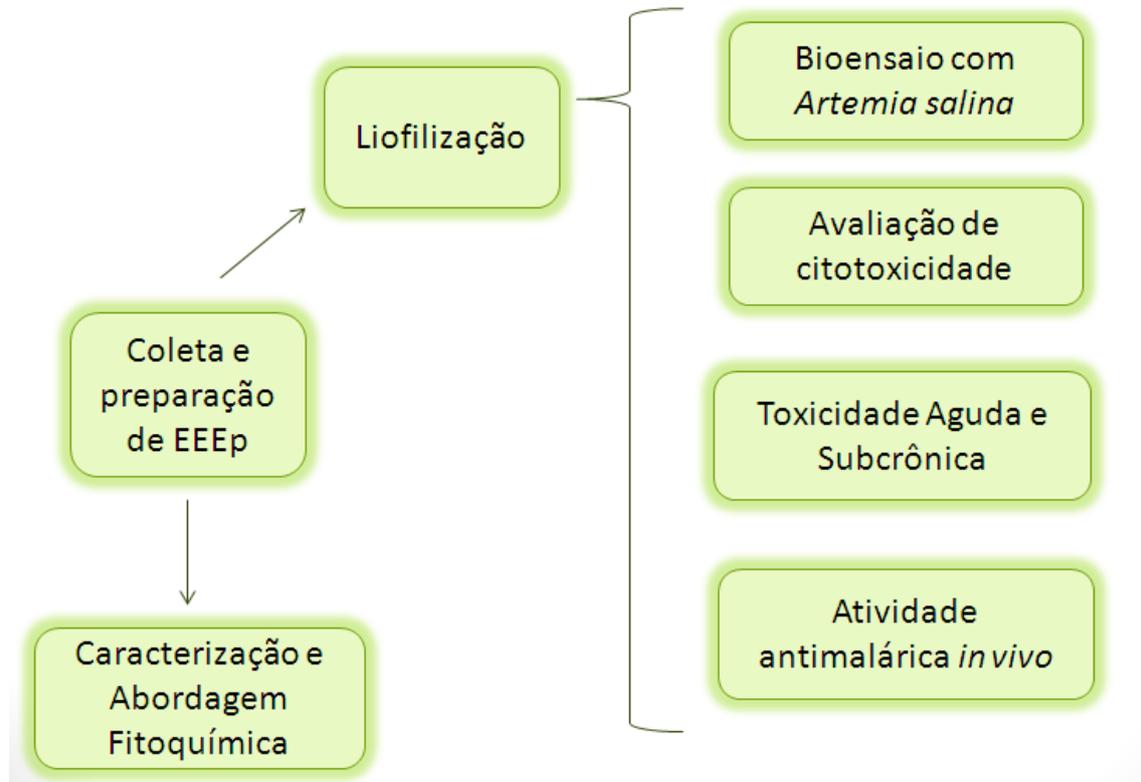


Figura 15: Resumo esquemático dos procedimentos experimentais deste trabalho.

3.1 MATERIAL BOTÂNICO

Os bulbos de *Eleutherine plicata* Herb., usados neste trabalho, foram coletadas na localidade de Vila Fátima, na município de Traquateua, BR 308, Km 178, 1°14' 36.0" S e 46°95' 51.1" O, a 22,82 metros acima do nível do mar. As coletas foram realizadas em setembro de 2010. A identificação da planta foi feita pela pesquisadora do Departamento de Botânica do Museu Paraense Emílio Goeldi, Dra. Marlia Regina Coelho Ferreira, sob a exsicata de número MG 202631

3.2 PROCESSAMENTO DO MATERIAL BOTÂNICO

Assim que chegaram, os bulbos do material vegetal foram separados e lavados com água corrente para retirada de sujeiras, musgo e insetos; em seguida, ficaram em estufa com circulação de ar a 60°C por duas horas para a inibição do seu metabolismo. Após isso, foram novamente lavadas em água corrente e banhadas com álcool 70 °GL.

Logo após, os bulbos foram deixadas em bancada por um dia, à temperatura ambiente, para a primeira secagem; posteriormente, a amostra foi secada em uma estufa de ar controlado (Estufa de Ar Quimis[®]) a aproximadamente 45 °C até secar completamente e atingir peso constante.

Depois de secos, os bulbos foram triturados em moinho de facas (Marconi[®]) até a obtenção do pó, que foi utilizado nos testes farmacognósticos e no preparo do extrato etanólico da planta.

Esta etapa foi realizada no Laboratório de Processamento de Extratos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Pará (UFPA).

3.3 PREPARAÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO DO BULBO DE *ELEUTHERINE PPLICATA*

O extrato etanólico foi obtido a partir do pó dos bulbos secos de *E. plicata*, por meio do processo de maceração exaustiva em etanol 96° GL, por sete dias. Após este período, o extrato etanólico foi filtrado e submetido a concentração em evaporador rotativo (modelo 802 série 72025 FISATOM[®] equipado com bomba de vácuo modelo TE-058) a 45° C até a retirada quase total do líquido extrator. Em seguida, este extrato foi levado à estufa à 40 °C por 2 dias para mais uma etapa de concentração, resultando no extrato bruto concentrado, que foi mantido em refrigerador. Uma parte deste material foi utilizada para os testes de abordagem fitoquímica.

Outra parte deste extrato concentrado foi levada ao liofilizador LIOTOP[®] (modelo L101, série 0421) para passar por um processo de secagem à frio (liofilização). O processo baseia-se no congelamento do extrato vegetal a uma temperatura adequada, próximo de -50 °C, e posteriormente a água é eliminada do material por sublimação (passagem direta do estado sólido para o gasoso), através de um controle rigoroso da pressão interna, que é mantido em níveis baixíssimos para

propiciar a mudança de estado físico. Como resultado final, foi obtido o extrato etanólico seco dos bulbos de *Eleutherine plicata* Herb, que foi utilizado em todos os ensaios toxicológicos e no ensaio da malária experimental *in vivo*.

Esta etapa foi realizada no Laboratório de Fitoquímica e no Laboratório de Controle de Qualidade da Faculdade de Farmácia e na Central de Extração da Faculdade de Química (UFPA).

3.4 ENSAIOS FARMACOGNÓSTICOS DA DROGA VEGETAL

3.4.1 GRANULOMETRIA

Cerca de 25 g do pó foram colocados em um conjunto de tamises de malhas de aberturas diferentes: 1,70 mm, 710 μ m, 250 μ m, 180 μ m e 125 μ m. O conjunto foi colocado em um tamisador vibratório, no qual o pó foi submetido a passagem forçada pelos tamises por vibração durante 30 minutos, primeiramente, em triplicata e depois por uma hora e trinta minutos. Após este processo realizou-se a pesagem dos tamises e do fundo coletor (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988).

3.4.2 DENSIDADE

Para determinação da densidade aparente, utilizou-se o método da proveta, no qual transferiu-se o pó da droga vegetal para uma proveta de 15 mL, devidamente tarada, tendo-se o cuidado de retirar partículas de ar que estavam presentes entre o pó. Este procedimento foi realizado até se completar o volume de 15 mL. Depois, pesou-se a proveta contendo o pó, e dividiu-se o peso do material pelo seu volume (15 mL) obtendo assim a densidade bruta (LACHMAN, 2001). Este procedimento foi feito em triplicata.

3.4.3 TEOR DE CINZAS

Três gramas de droga pulverizada foram pesadas e transferidas para um cadinho previamente calcinado. A droga foi, então, submetida à calcinação em mufla a 450 °C por uma hora e, posteriormente, resfriada em dessecador e pesada em balança analítica. Este procedimento foi repetido até a diferença de peso entre duas pesagens não ultrapassar 0,5 mg. (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988).

3.4.4 DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL HIDROGÊNIO

Preparou-se uma solução 1% (p/v) do pó do bulbo em água destilada, aquecida até a ebulição em chapa elétrica por 5 minutos. A solução resultante foi filtrada e após resfriamento foi medido o pH do filtrado em potenciômetro previamente calibrado (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988)

3.5 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA DO EXTRATO ETANÓLICO DE *ELEUTHERINE PLICATA*.

A abordagem fitoquímica foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Matos (1997).

3.5.1 ALCALÓIDES

Três mL do extrato foram transferidos para um vidro de relógio e evaporada em banho-maria. O resíduo foi retomado com 3 mL de solução de ácido clorídrico a 5%. A solução foi transferida sob filtração para dois tubos de ensaio em quantidades iguais. Em um dos tubos adicionou-se 3 gotas do reagente de Dragendorff e no outro, 3 gotas do reagente de Mayer. A formação de precipitado floculoso característico indica a presença de alcalóides.

3.5.2 FLAVONÓIDES

Dois mL do extrato foram transferidos para um tubo de ensaio. Adicionou-se a seguir 4 fragmentos de fita de magnésio e 4 gotas de ácido clorídrico concentrado. O aparecimento de cor vermelho-laranja indica a presença de flavonóides.

3.5.3 TANINOS

Transferiu-se 3 mL do extrato para um tubo de ensaio e completou-se o volume com água destilada para 10 mL. Acrescentou-se, então, uma gota de solução de cloreto férrico a 1%. A formação de precipitado escuro de tonalidade azul indica a presença de taninos pirogálicos (taninos hidrolizáveis) e verde, a presença de taninos flobabênicos (taninos condensados e catéquicos).

3.5.4 SAPONINAS

Dois mL do extrato foram transferidas para um tubo de ensaio e completou-se o volume com água destilada para 10 mL. Posteriormente, o tubo foi agitado vigorosamente durante um minuto, e observado nos 15 minutos seguintes. A formação de espuma persistente e abundante indica a presença de saponinas.

3.5.5 ANTRAQUINONAS

Três mL do extrato foram transferidos para um tubo de ensaio. A seguir, adicionou-se 3 mL de ácido sulfúrico a 10%. Agitou-se e acrescentou-se 3 mL de benzeno. A camada benzênica formada foi transferida para outro tubo de ensaio. Adicionou-se, então, a este tubo 2 mL de solução de hidróxido de amônio a 10%. O surgimento de cor vermelha, indica a presença de antraquinonas.

3.5.6 ESTERÓIDES E TRITERPENÓIDES

Três mL do extrato foram transferidos para um vidro de relógio. Evaporou-se em banho-maria e, posteriormente, agitou-se o resíduo seco com 3 mL de clorofórmio e transferir a solução formada para um tubo de ensaio. Adicionou-se, então, 1 mL de anidrido acético e 1 mL de ácido sulfúrico concentrado. O surgimento de coloração azul evanescente seguida de verde permanente é indicativa da presença de esteróides livres e o surgimento de coloração parda até vermelha indica triterpenóides livres.

3.5.7 CUMARINAS

Com um auxílio de um capilar, duas manchas de aproximadamente 1,5 cm de diâmetro foram feitas em um papel de filtro não-fluorescente. Aplicou-se sobre uma das manchas uma gota de solução alcoólica de hidróxido de potássio (KOH). Cobriu-se parcialmente as manchas com um cartão opaco não-fluorescente e expôs-se o conjunto à ação da luz U.V. por cerca de 2 minutos. O desenvolvimento de fluorescência azulada, forte, bem visível na metade não encoberta da mancha alcalinizada indica presença de cumarina.

3.5.8 QUINONAS

Cinco ml do extrato etanólico foram separadas em um tubo de ensaio. Adicionou-se ao tubo 2ml de solução 6N de NH_4OH . Formou-se, então as duas fases. Surgimento de cor vermelha na camada aquosa alcalina indica a presença de quinonas.

3.6 BIOENSAIO DE TOXICIDADE PRELIMINAR COM *ARTEMIA SALINA*

O bioensaio com *Artemia salina* Leach foi realizado de acordo com adaptações das metodologias de McLaughlin et al. (1998), Meyer et al. (1982) e Veiga (1989). O bioensaio foi dividido, metodologicamente, da seguinte forma:

- **Eclosão dos cistos:**

Para eclosão dos cistos de *A. salina*, foi preparada uma solução salina adequada ao desenvolvimento do microcrustáceo. Esta solução foi feita a partir da mistura de 38 g de sal marinho para cada litro de água destilada e alguns miligramas de bicarbonato de sódio (NaHCO_3) a fim de ajustar o pH da solução em um valor entre 8 - 9, com o uso de um potenciômetro (Meter[®]). Após homogeneização, filtrou-se por papel de filtro a solução. A solução foi aerada por agitação e transferida para um aquário de vidro com capacidade adequada, dividido em duas partes: a parte clara, separada por uma tampa de isopor com uma pequena entrada, iluminada e aquecida por uma lâmpada incandescente de 40 W, e a parte escura, coberta por papéis para que não passasse a luz transmitida pela lâmpada. Foram adicionados na parte escura 50 mg de cistos do microcrustáceo *Artemia salina*. Tal procedimento foi adotado para que os náuplios (larvas) viáveis passassem da parte escura para a clara por fototropismo.

Os cistos ficaram nesta solução por 24 h, em temperatura de cerca de 28 °C, tempo suficiente para eclosão dos mesmos e a migração dos respectivos náuplios viáveis para a zona clara do aquário. A solução foi mantida sob aeração com auxílio de uma bomba de ar para aquário.

Os períodos de incubação dos cistos foram estabelecidos conforme trabalhos anteriores realizados com a espécie, sendo de 24 horas, como proposto por Veiga (1989) e 48 horas, como proposto por Meyer et al. (1982).

- **Preparação das amostras de EEEp e realização do ensaio:**

Para o bioensaio de toxicidade, foram preparadas amostras do EEEp nas seguintes concentrações: 2000, 1000, 500, 250, 125, 62,5 e 31,2 µg/mL, adicionados de 50 µL de DMSO (para solubilização do extrato) em solução salina descrita acima (totalizando 5 mL/tubo para cada concentração e controle). No grupo controle, as artêmias foram mantidos somente nesta solução salina adicionado de 50 µL de DMSO. Os ensaios foram realizados em triplicata em tubos de vidro de 20 x 2 cm. Em cada um

dos tubos foi adicionado 10 exemplares de *A. salina* e mantidos por mais 24 e 48 horas sob iluminação e temperatura de 28 °C. Após esse período, foi feita a contagem das artemias vivas e mortos com auxílio de uma lupa e o cálculo da CL₅₀ (adaptado de MEYER *et al.*, 1982).

3.7 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE

A determinação da citotoxicidade do EEEp foi realizada no Laboratório de Bioensaios da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), sob a supervisão da Prof^a. Dr^a Alaíde Braga de Oliveira.

O ensaio do MTT (brometo de [3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5- difeniltetrazólio]) é uma técnica quantitativa que determina a interrupção de uma função bioquímica crítica. Este ensaio quantifica a atividade mitocondrial, através da absorção do sal MTT pelas células, sendo reduzido no interior da mitocôndria, pela enzima succinato desidrogenase, a um produto chamado formazan. Este produto, acumulado dentro da célula, é extraído por meio da adição de um solvente apropriado. Desta forma, é fornecida uma medida da função mitocondrial e, conseqüentemente, da viabilidade celular (MOSSMAN, 1983).

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados em células HepG2 A16, derivadas de hepatoblastoma primário humano. As células foram mantidas em estufa em atmosfera de CO₂ à 5%, à 37°C, em frascos estéreis de 25 cm² para cultivo de células, com meio RPMI (*Sigma Chem. Co.*), suplementado com 5 % de soro fetal bovino, penicilina (10 UI/mL) e esteptomicina (100 mg/mL), com trocas de meio de cultivo 2 vezes por semana (VAROTTI *et al.*, 2008).

As células foram usadas nos experimentos após tratamento com uma solução contendo 0,05% de tripsina e 0,5 mM de EDTA e plaqueadas em lâminas dentro de câmaras Lab-TekTM. Após confluência (80-90%), as monocamadas foram novamente tripsinizadas, lavadas e as células, contadas, diluídas em meio RPMI completo e distribuídas em microplacas de 96 poços (4x10⁵ células/100µl por poço) e incubadas em estufa de CO₂ à 37°C por 24h para a adesão das células aos poços da microplaca. Em seguida foram adicionados 100µL de meio completo contendo 4 diferentes concentrações do EEEp (1000, 100, 10 e 1 µg/mL) e do fármaco padrão cloroquina, em triplicata, diluídos com concentração final em DMSO (0,02% no meio de cultura). As

placas foram então incubadas por mais 24 h. Ao final deste período, foram adicionados 28µl/poço de uma solução de brometo 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol (MTT – *Sigma Chem. Co.*), na concentração de 2mg/mL em RPMI 1640 sem vermelho de fenol. Após 90 minutos de incubação a 37 °C com a solução contendo MTT, o sobrenadante foi descartado e em cada poço foi adicionados 130µL de DMSO P.A. A leitura foi realizada em espectrofotômetro com filtro 570 nm, com *background* em 630 nm.

A concentração letal mínima que inibiu em 50% o crescimento das células na presença dos compostos testes e da cloroquina (fármaco antimalárico controle) foi determinada em comparação com células cultivadas sem a presença de compostos, considerada 100% de crescimento.

Os resultados foram avaliados no programa Origin 8.0 com determinação das curvas dose-resposta traçadas com ajuste sigmoidal. Foram determinadas as concentrações letais (CL₅₀) que inibem em 50% o crescimento das células em relação aos controles sem as substâncias-teste.

3.8 TESTE DE TOXICIDADE ORAL AGUDA E SUBCRÔNICA

3.8.1 ANIMAIS E CONDIÇÕES DE ACOMODAÇÃO E MANUSEIO

Para os testes de avaliação de toxicidade oral aguda e subcrônica do EEep, foram utilizados camundongos (*Mus musculus*), linhagem *Swiss* (variedade albina), machos e fêmeas nulíparas e não grávidas (na toxicidade aguda) com peso corporal inicial de 25-27 g, provenientes do Biotério do Instituto Evandro Chagas (Ananindeua/PA) e mantidos na Sala de Experimentação da Faculdade de Farmácia da UFPA, em ambiente com temperatura controlada (23 ± 3°C), umidade em torno de 50-70%, ciclo de luz/escuro de 12 horas, baixos níveis de ruídos e com exaustão de ar.

Os animais foram mantidos com água filtrada e ração peletizada (ração Biobase-Biotec®) controlada (50 g por animal) em caixas de polipropileno (50 x 35 x 15 cm) com tampa metálica, forradas com palha de arroz e número máximo de 4 animais (machos e fêmeas separados) por caixa (que foi devidamente etiquetada para constar todos os dados e estado fisiológico diário dos mesmos). Ao final dos experimentos, os animais foram heparinizados (5000 UI/mL, 0,1 mL i.p.) e anestesiados (mistura constituída de 2

partes de Cloridrato de Ketamina + 1 parte de Xilazina, na dose de 2,5 mL/kg, via i.p), o sangue foi imediatamente coletado por punção cardíaca para as determinações bioquímicas e avaliação hematológica, na avaliação subcrônica, e os órgãos (fígado, rins, pâncreas, cérebro e coração) resseccionados para avaliação anatomo-histopatológica. As demais partes (carcaça) foram mantidas congeladas até o momento de serem recolhidas para incineração, no Instituto de Ciências Biológicas da UFPA.

Todos os procedimentos com animais estavam dentro das normas de experimentação animal, de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, segundo as Normas da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório - SBCAL (nova denominação do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (CoBEA). No Anexo 1 encontra-se o Parecer de Aprovação do CEPAN/IEC/SVS/MS do projeto “Contribuição para a ampliação do conhecimento acerca de plantas medicinais da RENISUS”, na qual este trabalho está também vinculado. Para garantir o cumprimento das diretrizes preconizadas pelo Comitê de Ética do Uso de Animais de Laboratório, o trabalho envolvendo animais (manuseio, treinamento e inspeção geral da qualidade de acomodação dos animais) contou com o apoio e supervisão do médico veterinário, Prof. Dr. Washington Luiz Assunção Pereira, da Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA).

3.8.2 TOXICIDADE AGUDA ORAL

Para os testes de toxicidade aguda oral do EEEp, foram utilizados os procedimentos de Dose Fixa da OECD 420, na sua versão revista adotada em 2001 (OECD 420, 2001), com algumas adaptações.

Os animais (camundongos fêmeas e machos, mantidos separadamente) foram aclimatados na Sala de Experimentação da Faculdade de Farmácia por cerca de cinco dias antes da administração do EEEp (reconstituído em água destilada e administradas por meio de gavagem, através de sonda gástrica de aço inox de 4 cm da *Becton & Dickinson Co*). Os animais foram divididos em gaiolas de uma maneira que não impedia a observação precisa de cada um.

Foram estabelecidos dois grupos, um com animais fêmeas e outro com os machos, tratados com EEEp; além de dois grupos controle organizados da mesma forma. Cada grupo continha 4 animais.

Os níveis de dose para o extrato foram estabelecidos para, no máximo, 3 doses suficientemente espaçadas (5000, 500 e 50 mg/Kg), a fim de mostrar os efeitos tóxicos e as diferentes taxas de mortalidade. Grupos controle foram tratados com água destilada. Caso a dose de 5000 mg/Kg não produzisse mortalidade nos grupos tratados, não haveria a necessidade de ser administrados os níveis inferiores. O volume administrado nos animais da substância-teste não excedeu 10 mL/Kg de peso corporal do animal.

Os animais foram observados durante um período de 14 dias. Os sinais de toxicidade foram registrados à medida que foram feitas as observações e que compreendam o momento de seu aparecimento, sua diminuição e sua duração.

Foi realizada uma avaliação ou *screening* hipocrático, que forneceu uma estimativa geral da natureza farmacológica e toxicológica da substância desconhecida, como: estado consciente e disposição, atividade e coordenação do sistema motor, reflexos, atividade sobre o Sistema Nervoso Central e o Periférico (MALONE e ROBICHAUD, 1983). O modelo de tabela hipocrática utilizada (Anexo 2), onde os dados avaliados foram reunidos, seguiu as sugestões de Brito (1994).

Ao final dos 14 dias de experimentação, os animais foram sacrificados e seus órgãos removidos para estudo anatomo-histopatológico.

3.8.3 TOXICIDADE SUBCRÔNICA

Para os testes de toxicidade oral subcrônica do EEEp, foram utilizados os procedimentos adaptados do *Guideline* da OECD 407, na sua versão atualizada, adotada em 2008.

Neste teste, foram utilizados camundongos machos, que receberam os mesmos tratamento já citado, no que diz respeito às condições de acomodação e alimentação. Foram empregados duas doses de EEEp, que foram definidas a partir dos resultados obtidos na toxicidade oral aguda: 100mg/kg (denominado Grupo BM) e 300 mg/kg (Grupo CM). Houve também um grupo controle (Grupo AM), tratado apenas com o veículo (água filtrada/destilada), e um grupo satélite (Grupo DM), com animais tratados com a maior dose do extrato (300mg/kg), que foi empregado para se observar a reversibilidade ou não de alguma manifestação tóxica que ocorrer, decorrido 14 dias após interrupção do tratamento com o EEEp.

Os animais receberam diariamente, no mesmo horário do dia e pelo mesmo experimentador, por via oral, o EEEp reconstituído em água filtrada/destilada e administradas por meio de gavagem, através de sonda gástrica de aço inox de 4 cm (*Becton & Dickinson Co*). Os sinais de toxicidade foram registrados à medida que forem realizadas as observações e que compreendem o momento de seu aparecimento, sua diminuição e sua duração. As observações abrangeram alterações da pele, pelos, mucosas, olhos, sistema circulatório e respiratório, sistemas nervoso central e periférico, atividade somatomotriz e manifestações comportamentais em geral.

Os animais também foram pesados diariamente e determinado a quantidade de água e alimento consumidos. O período definido para o teste de toxicidade subcrônica foi de 36 dias, com frequência de 6 doses/semana.

Os animais sobreviventes após os 36 dias foram submetidos à eutanásia, procedendo-se a coleta de sangue para determinação de parâmetros hematológicos e estudos anatomopatológicos (ressecção, análise macro/ microscópica do fígado, rins, cérebro, pâncreas e coração).

DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS

O sangue utilizado nesta determinação foi retirado por punção cardíaca. A análise laboratorial de parâmetros hematológicos envolveu estudo dos seguintes parâmetros: série branca (leucograma), hemoglobina, hematócritos, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e contagem de plaquetas.

Estas determinações foram realizadas em um Analisador Hematológico Pentra Retic 120 Horiba/ABX[®], do Laboratório de Análises Clínicas do Instituto de Ciências Biológicas da UFPA, sob a coordenação do Prof. Dr. José Ricardo dos Santos Vieira.

ESTUDOS ANATOMOPATOLÓGICOS E HISTOPATOLÓGICOS

Ao final dos experimentos de toxicidade aguda e subcrônica, os animais foram submetidos a eutanásia para ressecção de seus órgãos. As secções teciduais dos órgãos excisados foram fixadas em formalina (solução de formol a 10%) tamponada. Posteriormente, os órgãos foram preparados para processamento

histopatológico: sofreram desidratação com séries crescentes de álcool (70 a 100%), diafanização em xilol, impregnação e inclusão em parafina, segundo os métodos habituais (BACHA e WOOD, 1990). Em micrótomo, os fragmentos tissulares foram seccionados em espessura de 3,0 μM e subsequentemente submetidos à coloração hematoxilina-eosina e examinados ao microscópio óptico.

Os estudos anátomo e histopatológicos foram realizados no Laboratório de Patologia Clínica Animal do Instituto de Saúde e Produção Animal (ISPA) da UFRA, sob a supervisão do Prof. Dr. Washington Luiz Assunção Pereira.

3.9 AVALIAÇÃO DO EXTRATO SECO DE *E. Plicata* SOBRE ALGUNS PARÂMETROS DO ESTRESSE OXIDATIVO NA MALÁRIA MURINA

Para os ensaios envolvendo Malária Experimental *in vivo*, foram utilizados 30 camundongos machos (*Mus musculus*) da raça *Swiss*, adultos jovens (20-25 g de peso inicial), procedentes do Biotério do Instituto Evandro Chagas (Ananindeua/Pará). Os animais foram acomodados em uma sala de experimentação animal própria para este tipo de ensaio, anexa ao Biotério do Instituto de Ciências Biológicas da UFPA. Os animais foram divididos randomicamente em três grupos (10 animais por grupo), como segue:

Grupo A (CONTROLE): Os animais foram pré-tratados por 5 dias somente com o veículo de solubilização do extrato (água destilada v.o., 10 mL/kg), em seguida, injetados com 350 μL de solução salina estéril via i.p. e mantidos por mais 5 dias, com o mesmo tratamento (água destilada v.o., 10 mL/kg). Após este período, os animais foram submetidos à eutanásia, para coleta de sangue, cérebro e pulmão.

Grupo B (INFECTADOS): Os animais foram pré-tratados durante 5 dias somente com o veículo de solubilização do extrato (água destilada, 10 mL/Kg), em seguida, inoculados com *P. berghei* ANKA (150 μL de sangue infectado por *P. berghei* ANKA, diluído em 200 μL de solução salina estéril, via i.p.), e mantidos por mais 5 dias, com o mesmo tratamento (água destilada v.o., 10 mL/kg). Após este período, os animais foram submetidos à eutanásia, para coleta de sangue, cérebro e pulmão.

Grupo C (TRATADOS): Os animais foram pré-tratados durante 5 dias com dose única diária com o EEEp (300 mg/kg v.o., determinada com base nos resultados dos testes de toxicidade subcrônica) reconstituído em água destilada (10 mL/Kg), em seguida, inoculados com *P. berghei* ANKA (150 µL de sangue infectado por *P. berghei* ANKA, diluído em 200 µL de solução salina estéril, via i.p.), e mantidos por mais 5 dias, com o mesmo tratamento. Após este período, os animais foram submetidos à eutanásia, para coleta de sangue, cérebro e pulmão.

O sangue infectado com a cepa de *P. berghei* ANKA foi fornecido pelo Laboratório de Estudo do Estresse Oxidativo do Instituto de Ciências Biológicas da UFPA. Após a inoculação das hemácias infectadas com o parasito, os animais foram mantidos com água filtrada e ração peletizada (para roedores) *ad libitum* em caixas de polipropileno com tampa metálica, forradas com maravalha.

Após o período de infecção pré-estabelecido para cada grupo (5 dias) os animais foram heparinizados (5000 UI/mL, 0,1 mL i.p.), anestesiados com uma mistura constituída de 2 partes de Cloridrato de Cetamina 10% v/v + 1 parte de Xilazina 2,5% (v/v), na dose de 2,5 mL/kg, via i.p e submetidos à eutanásia para remoção de alíquota de sangue, do cérebro e pulmões.

3.9.1 PREPARAÇÃO DOS TECIDOS

Imediatamente após a eutanásia, o cérebro e o pulmão de cada animal foram cuidadosamente retirados e lavados com solução fisiológica gelada, para remoção de resíduos de sangue que porventura poderiam interferir nas análises nestes órgãos e conservados em freezer (-20 °C) até o momento de se realizar a homogeneização.

Para homogeneização, os órgãos foram fragmentados com auxílio de uma tesoura cirúrgica de aço inox e acrescentou-se então, às amostras, solução tampão salina fosfato (PBS) gelado na proporção 1:10 (m/m). Em seguida, o material foi sonificado em disruptor ultra-sônico de células (UNIQUE[®]) a 20 kHz e 500 W por 9 minutos (em banho de gelo). Após este procedimento, foi realizada a avaliação dos seguintes parâmetros: Capacidade Antioxidante Total Equivalente ao Trolox[®] (TEAC) e dosagem de Malondialdeído (MDA)

3.9.2 PARASITEMIA

A alíquota de sangue foi utilizada para contagem de parasitos, que se procedeu da seguinte forma: foi realizado um esfregaço sanguíneo, corado pelo método de Giemsa, contando-se, em um total de 1000 hemácias, o número de hemácias parasitadas. A razão porcentual entre o número de hemácias parasitadas e o número de hemácias contadas (1000) foi considerada como o grau de parasitemia.

3.9.3 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL EQUIVALENTE AO TROLOX[®] (TEAC)

O potencial antioxidante foi determinado segundo a sua equivalência a um potente antioxidante conhecido, o TROLOX[®] (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-cromono-2-carboxílico; Aldrich Chemical - Co), análogo sintético hidrossolúvel da vitamina E. Trata-se de uma técnica colorimétrica baseada na reação entre o ABTS (2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolína-ácido-6-sulfônico-diamônio) com persulfato de potássio ($K_2S_2O_8$), produzindo diretamente o radical cátion $ABTS^{+\bullet}$, cromóforo de coloração verde/azul, com absorvância máxima nos comprimentos de onda 645, 734 e 815nm. A adição de antioxidantes a este radical cátion pré-formado o reduz novamente a ABTS, na extensão e escala de tempo dependente da capacidade antioxidante, concentração de antioxidantes e duração da reação. Isto pode ser mensurado por espectrofotometria pela observação da mudança na absorvância lida a 734nm durante um determinado intervalo de tempo. Assim, a extensão da descoloração, como índice de inibição do radical cátion $ABTS^{+\bullet}$ foi determinada como a atividade antioxidante total da amostra, sendo então calculada a sua relação com a reatividade do TROLOX[®] como padrão, sob as mesmas condições. Os resultados foram expressos em mM/L

3.9.4 DOSAGEM DO MALONDIALDEÍDO (MDA)

O método se baseia na reação do malondialdeído com o ácido tiobarbitúrico (TBA), em pH baixo e temperatura elevada, para formar o complexo MDA-TBA-MDA, de cor rósea e absorção máxima em 535nm.

O ensaio seguiu as seguintes etapas: Nos tubos de ensaios utilizados, foi pipetado 1 mL do reagente TBA (10 nM). Logo depois, no tubo utilizado como controle branco, pipetou-se 0,5 mL de água destilada. No tubo utilizado como controle padrão de MDA, foi pipetado 0,5 mL de solução padrão de MDA 20 µM. Por fim, nos demais tubos, foi pipetada 0,5 mL de amostra em cada um.

Terminada a pipetagem das amostras, os tubos foram acondicionados em aparelho de banho-maria termostatizado digital (BENFER™, Modelo BBM1000) à temperatura constante de 94°C, por uma hora. A fim de evitar perda ou contaminação cruzada das amostras com a água condensada dentro do banho-maria, cada tubo foi tampado com uma bola de vidro.

Após este tempo, as amostras foram resfriadas em temperatura ambiente durante 15 minutos, aproximadamente. Terminado o resfriamento, foi acrescentado em cada tubo de ensaio 4 mL de álcool n-butílico. Eles foram , então tampados e misturados individualmente em agitador de tubos tipo vortex, a fim de haver máxima extração do MDA para a fase orgânica.

Por fim, os tubos foram destampados e , então, centrifugados durante 10 minutos (BENFER™, Modelo BMC), a fim de haver completa separação de fases. Da fase orgânica superior, foi retirada uma pequena alíquota para ser lida em espectrofotômetro (SHIMADZU™, Modelo UV 1800), no comprimento de onda de 535 nm. Todas as leituras foram realizadas em duplicata. Os resultados foram expressos em ng/mL

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para cálculo da CL_{50} no teste de toxicidade em *A. salina*, foi usado o ajuste logarítmico das curvas de toxicidade (percentual de letalidade x log da concentração do EEEp), empregando-se o software GraphPad Prisma® 5.0..

Na determinação da citotoxicidade, a concentração letal mínima que inibe em 50% o crescimento das células na presença da droga padrão e dos compostos testes foi determinada em comparação com células cultivadas sem a presença das substâncias-teste, considerada 100% de crescimento. Os resultados foram plotados no programa Origin 8.0 com determinação das curvas dose-resposta, traçadas com ajuste sigmoidal. Foram determinadas as concentrações citotóxicas que inibem em 50% o crescimento das células (CL_{50}) em relação aos controles sem fármaco-padrão.

No ensaio de toxicidade aguda oral, para avaliar se houve diferença significativa da evolução ponderal, do consumo de ração e água entre os animais controles e tratados com EEEp, estes resultados foram expressos em média \pm desvio padrão para cada grupo de animais e analisados pelo Teste "t" de *Student*, sendo considerado um nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

Nos testes de toxicidade subcrônica em camundongos, os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão para cada grupo de animais. Os resultados foram analisados realizando-se análise de variância (ANOVA) seguido do *pos hoc test*, o Teste de Tukey, com limites de confiança de 95 %.

Para os parâmetros oxidativos também foi utilizado o ANOVA, seguido do Teste de Tuckey, enquanto que na comparação da parasitemia entre os animais dos diferentes no modelo da malária murina, foi realizado o teste "t" de *Student*.

Para os testes citados acima foram utilizados os softwares Microsoft Excel[®] 2010 e BioEstat[®] 5.0 e em todos foi considerado um nível de significância de $p \leq 0,05$.

Resultados e Discussões

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A determinação de alguns parâmetros físico-químicos da droga vegetal e a abordagem fitoquímica visam nos fornecer informações acerca da qualidade da matéria-prima utilizada e da composição química e características físicas dos seus constituintes.

Estas informações são fundamentais para que se tenha um conjunto de informações preliminares que permita conhecer o material a ser submetido aos estudos de toxicidade e de atividade biológica, já que a toxicidade, por exemplo, está ligada a composição e estrutura química dos componentes do material, e as impurezas podem alterar a toxicidade ou a atividade biológica (OGA, 1996).

4.1 GRANULOMETRIA, PH, DENSIDADE E TEOR DE CINZAS

Aproximadamente 39% do pó dos bulbos da planta ficou retido no tamiz de malha 250 μm , portanto segundo a Farmacopéia Brasileira (1988), este pó foi classificado como moderadamente grosso (Tabela 1).

A fragmentação da droga vegetal também tem sua influência para o processo extrativo, justificando a pulverização do material vegetal para, desta forma, aumentar a superfície de contato da droga vegetal com o líquido extrator, porém, um tamanho muito reduzido do pó pode causar a perda de compostos de interesse (LIST e SCHMIDT, 2000).

Por sua vez, pós muito grossos tem sua superfície de contato com o solvente diminuída, o que também, pode reduzir a eficácia do processo. Segundo Brandão (2010), para extrações alcoólicas o ideal é a utilização de pós finos, porém, em outro estudo que envolve atividade antiplasmódica e avaliação de toxicidade, o pó utilizado também foi classificado como moderadamente grosso (COSTA et al.,2009). A densidade do pó encontrada foi 0,76 (Tabela 2).

Tabela 1: Resultados do ensaio de granulometria do pó de *Eleutherine plicata*

Malha	Resultados*
1700 µm	0,831 ± 0,29
600 µm	11,274 ± 9,52
250 µm	38,799 ± 20,36
180 µm	17,973 ± 10,32
125 µm	12,183 ± 4,36
Fundo coletor	19,002 ± 17,03

* %Média ± Desvio Padrão

O pH do extrato foi 6,5, o que pode indicar a presença majoritária de substâncias de caráter ácido (Tabela 2). O teor de cinzas totais do pó da planta foi 2,11 (Tabela 2). Este parâmetro avalia a matéria inorgânica, principalmente sais inorgânicos, que são obtidos por incineração completa da amostra (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 1988). *Eleutherine plicata* não possui uma monografia farmacopéica que especifique o valor máximo permitido de teor de cinzas, portanto não é possível determinar se a amostra botânica tinha quantidade considerável de adulterantes inorgânicos.

Tabela 2: Resultado dos ensaios físico-químicas do pó dos bulbos de *Eleutherine plicata*

Testes Físico-Químicos	Resultados*
Densidade (g/mL)	0,757 ± 0,02
% Teor de Cinzas Totais	2,11 ± 0,04
pH	6,5 ± 0,02

* Média ± Desvio Padrão

4.2 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA

A abordagem fitoquímica feita com o extrato alcoólico dos bulbos de *Eleutherine plicata* mostrou a presença das seguintes classes de metabólitos secundários: antaquinonas, cumarinas, taninos condensados, triterpenos, esteroides e quinonas, resultados semelhantes aos descritos por Malheiros (2008) em seu trabalho.

O gênero *Eleutherine* é amplamente conhecido pela presença de diversas naftoquinonas, e derivados delas, na composição de seu extrato (MALHEIROS, 2008; HARA et al., 1997; PARAMAPOJN et al., 2008). Essas substâncias aparentemente são as responsáveis pelas atividades biológicas (antibacterianas e antifúngicas) atribuídas ao vegetal (IFESAN et al, 2009 ; ALVES et al., 2003). Além disso, naftoquinonas são conhecidos indutores de estresse oxidativo (KLAUS et al., 2010; SHI et al., 1994), além de haver relatos de uma possível atividade inibidora da formação de NO (SONG et al., 2009; HAN et al., 2008), ambas considerações importantes, discutidas por diversos autores em trabalhos referentes a malária (BECKER et al., 2004; BERENDT et al., 1990; CHIKAWATA, 2000; PINO et al., 2003) .

4.3 BIOENSAIO DE TOXICIDADE EM *ARTEMIA SALINA*

A exposição dos microcrustáceos à diferentes concentrações de extrato, após o período de 24 e 48 horas de eclosão (Figuras 16 e 17), mostrou que a concentração letal média (CL₅₀) em ambos os casos é superior a 1000 µg/mL; para exposição após as 24 h de eclosão, o valor médio encontrado foi de 1808 µg/mL, e para exposição após 48 h de eclosão, o valor médio encontrado foi 1004 µg/mL.

Os microcrustáceos, ao final do teste realizado no período de incubação de 48 horas, estavam na fase metanáuplio II. Nestas fases, os animais iniciam o processo de filtração, portanto o epitélio do trato digestivo do animal entra em contato com o meio externo, tornando este mais sensível ao teste (SORGELOS et al. 1978).

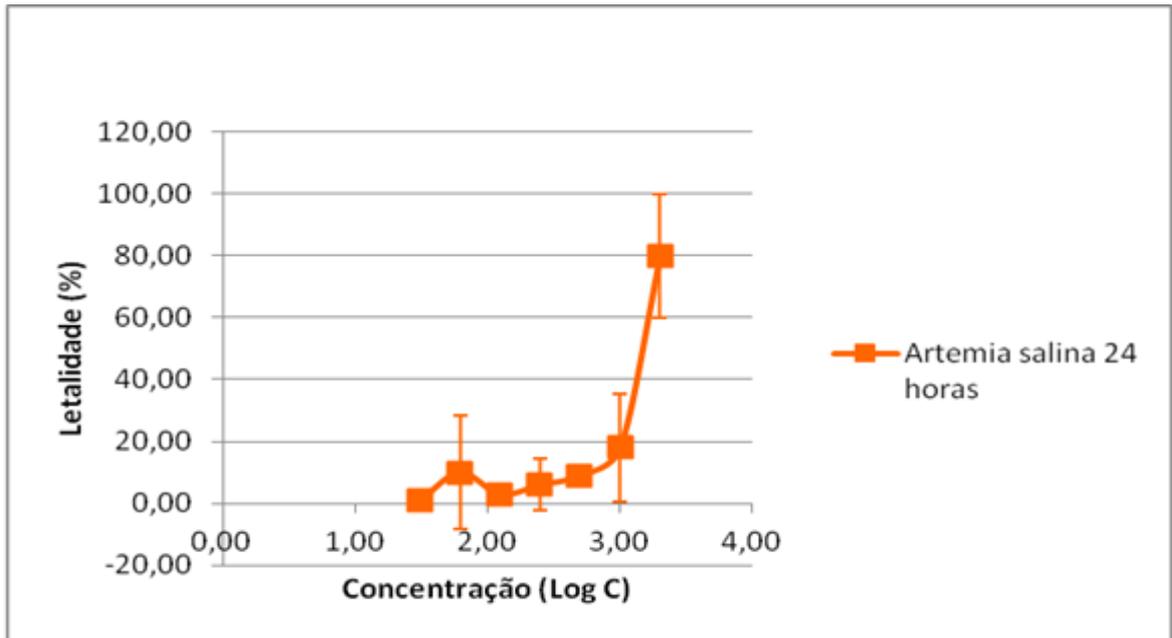


Figura 16: Percentual de letalidade de metanauplios de *Artemia salina* em função das doses do EEEp no período de incubação de 24 horas. Os pontos representam as médias da concentração logarítmica e as barras o Desvio Padrão.

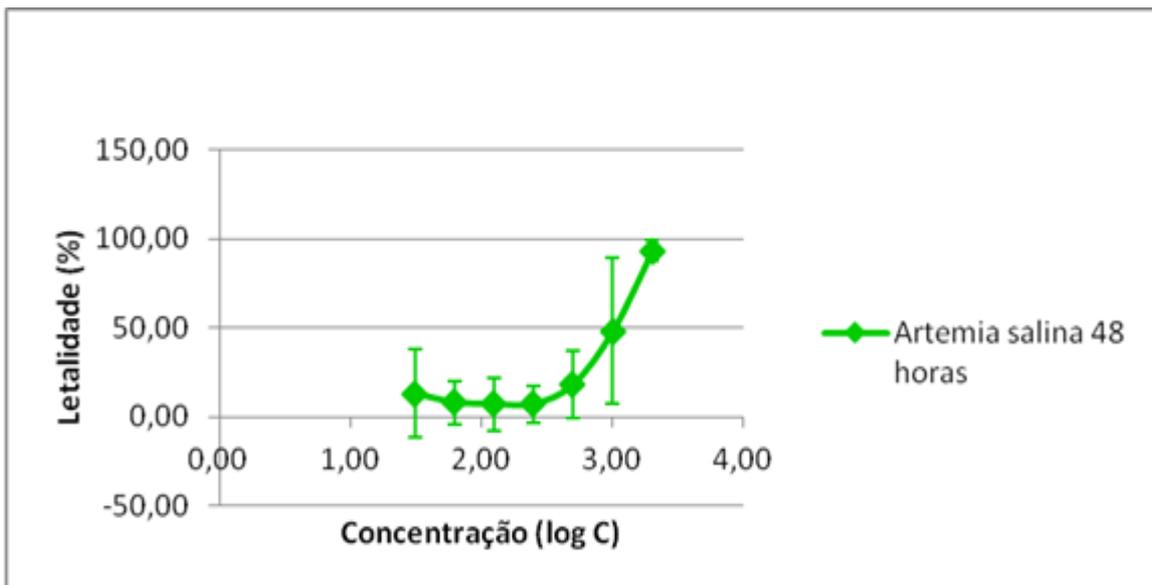


Figura 17: Percentual de letalidade de metanauplios de *Artemia salina* em função das doses do EEEp no período de incubação de 48 horas. Os pontos representam as médias da concentração logarítmica e as barras o Desvio Padrão.

De acordo com a metodologia de Meyer et al. (1982), foi estabelecida uma relação entre o grau de toxicidade e a CL_{50} , apresentada por substâncias sobre as

larvas de *A. salina*. Segundo este estudo, considera-se que resultados de concentração letal média maiores que 1000 µg/mL classificam o extrato como atóxicos. Dolabela (1997) em seus estudos com extratos vegetais estabeleceu critérios de classificação do nível de toxicidade com base nos resultados de CL_{50} em *A. salina*, na qual valores de $CL_{50} < 80$ µg/mL são considerados altamente tóxicos, entre 80 e 250 µg/mL são considerados moderadamente tóxicos e $CL_{50} > 250$ µg/mL são considerados com baixa toxicidade.

Nestes termos, o EEEp utilizado pode ser considerado de baixa toxicidade, tanto com metanauplios com 24 horas, quanto com 48 horas de vida.

4.4 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE

A linhagem celular HepG2 A16 é bastante utilizada no meio científico para investigação de compostos naturais com atividade antiplasmódica *in vitro*, servindo como hospedeiro para o plasmódio em estudos que emulam a fase extra-eritrocítica, permitindo, dessa forma, a análise do efeito esquizonticida do composto candidato a droga antimalárico, além de permitir o cálculo do índice de seletividade da substância testada que a representa (VAROTTI et al. 2008).

A concentração citotóxica capaz de inibir 50% de crescimento das células (CC_{50}) encontrada para o EEEp foi de 61,55 µg/mL (Figura 18). A cloroquina, que foi utilizada como padrão, apresentou CC_{50} de 262,33 µg/mL (Figura 19).

Embora a CC_{50} do EEEp tenha sido menor que da cloroquina, apresentando assim uma maior citotoxicidade em relação a este antimalárico, muito usado como padrão em testes de avaliação antiplasmódica *in vitro*, o extrato não foi considerado citotóxico. Os critérios adotados no Laboratório de Bioensaios da Faculdade de Farmácia da UFMG consideram “citotóxico”, substâncias que possuem uma CC_{50} inferior a 10 µg/mL, baseando-se no seu índice de seletividade quando comparados com resultados de avaliação de atividade antiplasmódica *in vitro*. Uma fração diclorometânica deste extrato apresentou CC_{50} de 9,0 µg/mL, esta sim considerada citotóxica (dados não mostrados)

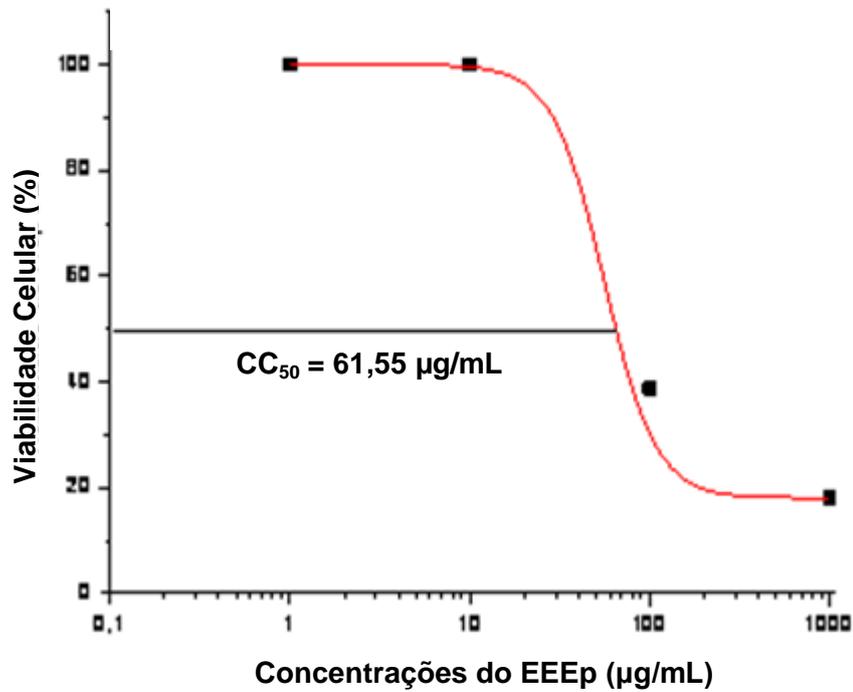


Figura 18: Curva dose-resposta do EEEp em células HepG2A16, mostrando o valor da concentração citotóxica que inibe 50% do crescimento das células (CC₅₀).

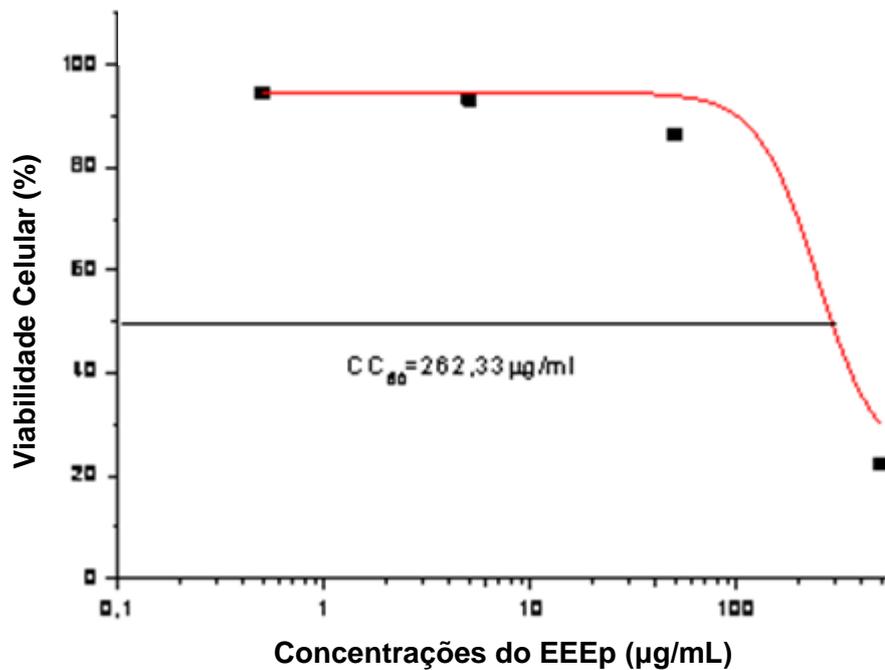


Figura 19: Curva dose-resposta da Cloroquina em células HepG2A16, mostrando o valor da concentração citotóxica que inibe 50% do crescimento das células (CC₅₀).

Os resultados observados no teste de citotoxicidade foram similares aos encontrados no bioensaio com *Artemia salina*, ambos indicando que o ensaio não apresentou toxicidade relevante.

4.5 TESTE DE TOXICIDADE ORAL AGUDA

Durante o “*Workshop*” Internacional organizado pela ICCVAM (*Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods*) em 2002, a situação corrente dos métodos *in vitro* para a avaliação da toxicidade aguda oral foi estudada. Deste estudo, um processo foi iniciado para oferecer objetivos realísticos em curto prazo e longo prazo para o refinamento e substituição de estudos animais, pelo menos para a toxicidade aguda oral, sendo os mesmos princípios aplicáveis a toxicidade dérmica e inalatória (ICCVAM, 2003).

Embora naquele momento os ensaios de citotoxicidade *in vitro* ainda não estivessem padronizados e validados, ou mesmo existissem protocolos otimizados e modelos preditivos, estudos consistentes da literatura apontavam para uma correlação positiva entre citotoxicidade *in vitro* e efeitos tóxicos agudos *in vivo*. O documento final concluiu que a proposta de Spielmann et al.(1999), na qual a citotoxicidade basal medida em um ou mais células ou linhagens celulares é relacionada com a toxicidade aguda *in vivo*, e poderia ser rapidamente absorvido para otimizar a seleção de dose inicial nos testes de toxicidade aguda já propostos. Todavia, também foi concluído que a substituição de testes em animais pelos ensaios *in vitro* ainda era prematura e necessitaria de muito mais tempo para ser implementada. Conclusões adicionais foram o desenvolvimento, padronização e a validação de métodos *in vitro* para a predição de toxicidade em humanos ao invés de roedores a serem conduzidas como medidas a longo prazo (SPIELMANN et al.1999).

O método de Dose Fixa estabelece a administração oral de uma dose da substância-teste em camundongos Swiss de ambos os sexos e observações nas primeiras horas após a administração e uma vez por dia, sempre no mesmo horário até completar 14 dias de observação (BRITO, 1994)

A triagem farmacológica e comportamental (avaliação ou *screening* hipocrático) foi realizada de acordo com avaliação proposta por Malone e Robichaud (1983)

modificado por Brito (1994), conforme o Anexo 2, fornecendo uma estimativa geral da natureza farmacológica e toxicológica do EEEp.

Durante todo o período do experimento os animais machos e fêmeas tratados com EEEp (5000mg/kg) não apresentaram nenhum dos sinais de toxicidade evidente. Também não foi observada a morte de nenhum dos animais durante os catorze dias de experimento.

A administração do EEEp na dose de 5000 mg/Kg não alterou de maneira significativa a evolução ponderal e o consumo de alimentos de ambos os sexos em relação aos respectivos grupos controle (Tabelas 3 e 4)

Foi realizado exame morfológico externo e análise macro e microscópica do cérebro e cerebelo, estômago, intestinos, mesentério, o coração, pulmão, fígado e rins de todos os animais

A avaliação macroscópica dos órgãos avaliados não revelou qualquer alteração anatômica. Microscopicamente, corações e rins observados estavam histologicamente normais. Nos hepatócitos dos animais de todos os grupos observados, inclusive do grupo controle, foi detectada a presença de esteatose macrovesicular discreta. Essas alterações provavelmente ocorreram ou devido à alimentação ou por estresse, causado pela manipulação diária, que induz a liberação cortisol e adrenalina, mobilizando triglicerídeos e ácidos graxos.

Não foi detectada a presença de corpos estranhos, processos inflamatórios ou presença de líquido nos alvéolos, estando a estrutura pulmonar de maneira normal. Cérebro e cerebelo, estômago e intestino delgado também estavam sem alterações.

Tabela 3: Variação da evolução ponderal de camundongos (machos e fêmeas) tratados com dose única do EEEp (5000 mg/Kg) e observados durante 14 dias.

Tratamento	Variação de peso (g)*	
	Machos	Fêmeas
Controle	9,4 ± 1,1	7,8 ± 3,0
EEEp (5000 mg/Kg)	10,1 ± 1,5 ^{NS}	8,4 ± 1,9 ^{NS}

* Os valores estão expressos em média ± desvio padrão (n=4).

^{NS} Não significativo (p > 0,05). Teste "t" de Student.

Tabela 4: Consumo de ração pelos camundongos (machos e fêmeas) tratados com dose única de EEEp (5000 mg/Kg) e observados durante 14 dias.

Tratamento	Consumo médio de ração (g/dia)*	
	Machos	Fêmeas
Controle	8,08 ± 2,3	9,12 ± 0,9
EEEp (5000 mg/Kg)	9,20 ± 2,3 ^{NS}	8,33 ± 1,3 ^{NS}

* Os valores estão expressos em média ± desvio padrão (n=4).

^{NS}Não significativo ($p > 0,05$). Teste “t” de Student.

4.6 TESTE DE TOXICIDADE ORAL SUBCRÔNICA

A toxicidade subcrônica tem como objetivo principal investigar os aspectos toxicológicos de uma substância-teste administrada repetidamente e em dosagens diferentes por um período de tempo prolongado, podendo ser de um a três meses (BRITO, 1994). Assim, a toxicidade pode ser desencadeada por doses cumulativas da substância no organismo ou ainda pode resultar de danos progressivos que a substância pode vir a causar (OGA, 1996)

O teste de toxicidade subcrônico foi realizado em camundongos Swiss machos. O EEEp foi administrado por via oral, nas doses de 100 e 300 mg/Kg. Um grupo de animais satélite foi tratado com EEEp na maior dose estabelecida para o teste, com objetivo de se observar a reversibilidade ou não das manifestações tóxicas, mantidos vivos por mais 14 dias após a interrupção do tratamento.

O ensaio foi conduzido por um período de 36 dias (tratamento de 6 dias/semana). O grupo controle foi mantido de maneira idêntica e tratado somente com água por via oral (10 mL/kg). Findo o período, os animais foram submetidos a eutanásia, como já descrito e retirado os órgãos para análise histopatológica e sangue para a avaliação dos parâmetros hematológicos. Ao longo dos tratamentos, foram avaliados parâmetros como comportamento, mudança de características, evolução ponderal, consumo de água e ração.

Durante todo o período de tratamento, não houve quaisquer alterações que indicassem toxicidade causada pelo EEEp, tanto na dose de 100 mg/kg quanto na de 300 mg/kg ou no grupo satélite. De maneira geral, a administração do EEEp não alterou

de maneira significativa a evolução do ganho de peso dos animais que participaram do estudo (Tabela 5).

Tabela 5: Variação da evolução ponderal semanal dos camundongos tratados com EEEp nas doses de 100 e 300 mg/kg.

Semanas de experimentação	Evolução Ponderal (g)*		
	Grupo Controle	EEEp 100 mg/kg	EEEp 300 mg/kg
1 ^a	0,96 ± 0,44	0,30 ± 0,62	1,18 ± 0,36
2 ^a	-0,59 ± 1,65	0,19 ± 0,4	1,15 ± 0,61
3 ^a	1,51 ± 0,41	1,44 ± 0,3	0,97 ± 0,57
4 ^a	-0,08 ± 0,67	-0,17 ± 1,07	-0,17 ± 0,47
5 ^a	0,06 ± 0,59	-0,03 ± 0,56	0,27 ± 0,47
6 ^a	0,41 ± 1,41	0,185 ± 0,44	0,185 ± 1,01

*Os valores representam a Média ± Desvio Padrão. N=10 animais/grupo

A administração do EEEp nas diferentes doses também não alterou, de maneira significativa, o consumo de ração e água dos animais avaliados durante o período do tratamento (Tabela 6 e 7).

Tabela 6: Variação do consumo de ração dos camundongos tratados com EEEp nas doses de 100 e 300 mg/kg.

Semanas de experimentação	Consumo de Ração (g)*		
	Grupo Controle	100 mg/kg	300 mg/kg
1 ^a	7,22 ± 0,99	8,17 ± 1,35	8,15 ± 1,3
2 ^a	7,56 ± 1,7	7,69 ± 1,66	7,3 ± 1,89
3 ^a	7,87 ± 0,35	7,48 ± 0,79	6,46 ± 0,51
4 ^a	6,29 ± 0,39	6,35 ± 0,41	5,48 ± 0,43
5 ^a	6,28 ± 0,55	5,63 ± 0,53	5,46 ± 0,44
6 ^a	6,07 ± 0,00	5,18 ± 0,00	5,64 ± 0,00

* Os valores estão expressos em média ± desvio padrão. N=10 animais/grupo

Tabela 7: Variação do consumo de água dos camundongos tratados com EEEp nas doses de 100 e 300 mg/kg .

Semanas de experimentação	Consumo de Água (mL)*		
	Controle negativo	100 mg/kg	300 mg/kg
1	8,27 ± 1,35	10,37 ± 1,84	10,03 ± 0,63
2	6,74 ± 2,41	6,34 ± 1,86	6,44 ± 2,1
3	7,15 ± 2,05	6,97 ± 2,03	6,24 ± 1,99
4	7,00 ± 1,14	6,73 ± 0,48	6,43 ± 1,26
5	5,54 ± 1,28	5,96 ± 0,50	5,67 ± 0,63
6	3,75 ± 0,00	5,50 ± 0,00	5,00 ± 0,00

* Os valores estão expressos em média ± desvio padrão. N=10 animais/grupo

A avaliação dos parâmetros hematológicos em animais submetidos a longos tratamentos com substâncias-teste constitui importante ferramenta no estudo da toxicidade subcrônica e crônica (BRITO, 1994).

O resultado da avaliação dos parâmetros hematológicos dos grupos controle (AM), tratados com o EEEp na dose de 100 mg/Kg (BM), 300 mg/kg (CM) e Satélite (DM, dos de 300 mg/kg) são mostrados na Tabela 8 e nas Figuras 21 a 28.

De uma maneira geral, podemos observar uma diminuição estatisticamente significativa ($p < 0,05$) na quantidade de hemácias (Figura 21), de hemoglobina (Figura 22) e no hematócrito (Figura 23), para o grupo Satélite, quando comparados ao controle, e das plaquetas ($p < 0,05$) no grupo tratado com EEEp na dose de 300 mg/kg quando comparado aos animais controle.

A concentração de hemoglobina correlaciona-se estreitamente com a contagem de hemácias. Baixas concentrações de hemoglobina, hemácias e hematócrito podem indicar anemia, hemorragia recente ou retenção de líquido, causando hemodiluição (LIMA, et al., 2008). Vale ressaltar que tais resultados não foram confirmados por alterações no VCM, HCM e CHCM destes animais (Figuras 24, 25 e 26). A caracterização semiológica de qualquer anemia exige o conhecimento de dados hematológicos, como por exemplo, o valor globular ou grau de coloração eritrocitária e o tamanho das hemácias (GORINA, 1984; MILLER, 1999).

Tabela 8: Parâmetros hematológicos de camundongo machos tratados com diferentes doses do EEEp durante o ensaio de toxicidade subcrônica*.

Parâmetros	Controle	EEEp 100 mg/kg	EEEp 300 mg/kg	Satélite (EEEp 300 mg/kg)
Leucócitos($10^3/\text{mm}^3$)	7,5 ± 0,00	8,16 ± 3,23	5,42 ± 1,70	8,33 ± 1,95
Hemácias ($10^6/\text{mm}^3$)	8,57 ± 0,47	7,98 ± 0,60	8,08 ± 0,45	7,26 ± 1,1 ^A
Hemoglobina (g/dL)	13,6 ± 0,7	12,79 ± 0,9	13,09 ± 0,52	11,91 ± 1,4 ^A
Hematócrito(%)	40,03 ± 2,40	40,03 ± 3,33	40,12 ± 2,03	36,58 ± 5,23 ^A
VCM (fm^3)	50,22 ± 1,72	50,00 ± 1,00	49,78 ± 0,97	50,44 ± 1,51
HCM (pg)	15,9 ± 0,61	15,7 ± 1,22	16,21 ± 0,63	16,47 ± 0,98
CHCM (g/dL)	31,63 ± 0,47	31,97 ± 0,81	32,59 ± 1,18	32,69 ± 1,88
Plaquetas ($10^3/\text{mm}^3$)	550,89 ± 87,55	503,11 ± 65,1	392,78 ± 68,07 ^A	442,11 ± 134,71

^Ap < 0,05 em comparação com o grupo controle; ANOVA *One Way*/Tukey

*Os Valores são expressos em média ± Desvio Padrão.

Outra consideração importante aqui é que a redução destes parâmetros hematimétricos se deu no grupo satélite (mas não no grupo tratado com EEEp na dose de 300 mg/kg), ou seja, o grupo cujos animais foram tratados com o EEEp na dose 300 mg/kg por 6 semanas e, depois, tiveram o tratamento interrompido por mais 2 semanas, quando foram submetidos a eutanásia para coleta do sangue. Isto é importante, se levarmos em conta que a idade avançada dos animais deste grupo pode alterar alguns parâmetros bioquímicos e hematológicos (DINIZ, 2000; UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS, 2011).

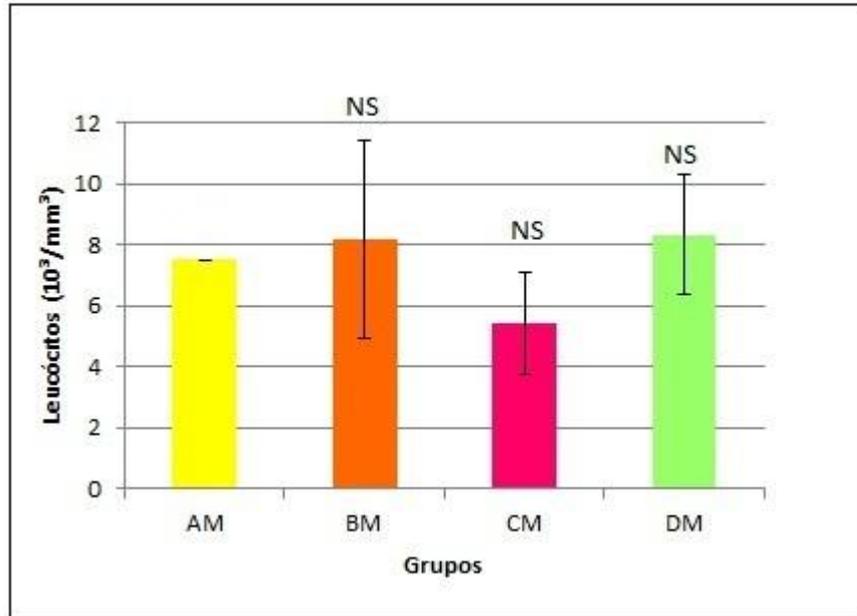


Figura 20: Resultado da contagem de leucócitos totais ($10^3/\text{mm}^3$) nos animais controle (AM), tratados com EEEp 100 mg/kg (BM), tratados com EEEp 300 mg/kg (CM) e satélite (DM). As colunas representam as Médias e as barras, o Desvio Padrão

^{NS}Diferença não significativa entre os grupos estudados; ANOVA *One Way/Tuckey*.

As colunas representam as Médias e as barras, o Desvio Padrão.

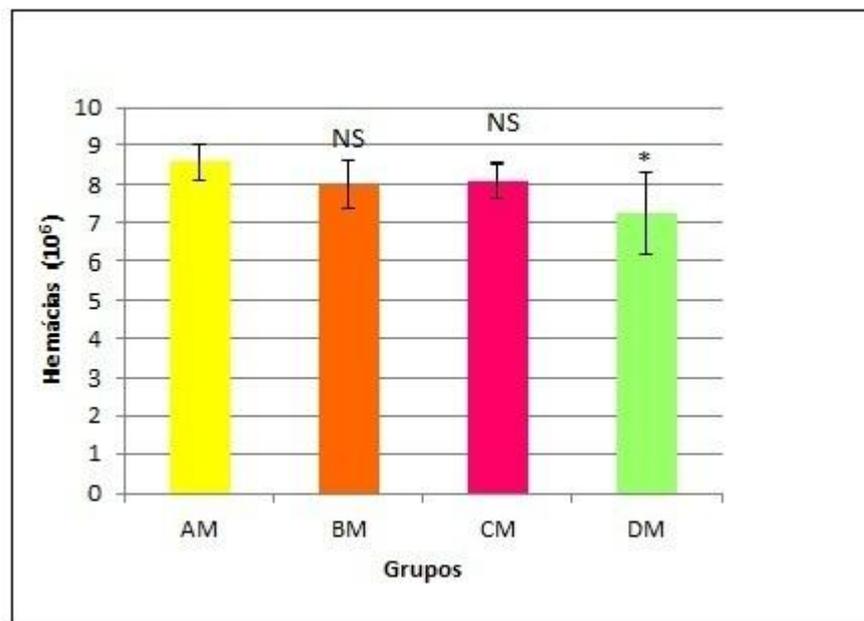


Figura 21: Resultado da contagem de hemácias (10^6) nos animais controle (AM), tratados com EEEp 100 mg/kg (BM), tratados com EEEp 300 mg/kg (CM) e satélite (DM). As colunas representam as Médias e as barras, o Desvio Padrão

^{NS}Diferença não significativa entre os grupos estudados; ANOVA *One Way/Tuckey*.

* $p < 0,05$ em comparação com o grupo controle; ANOVA *One Way/Tukey*.

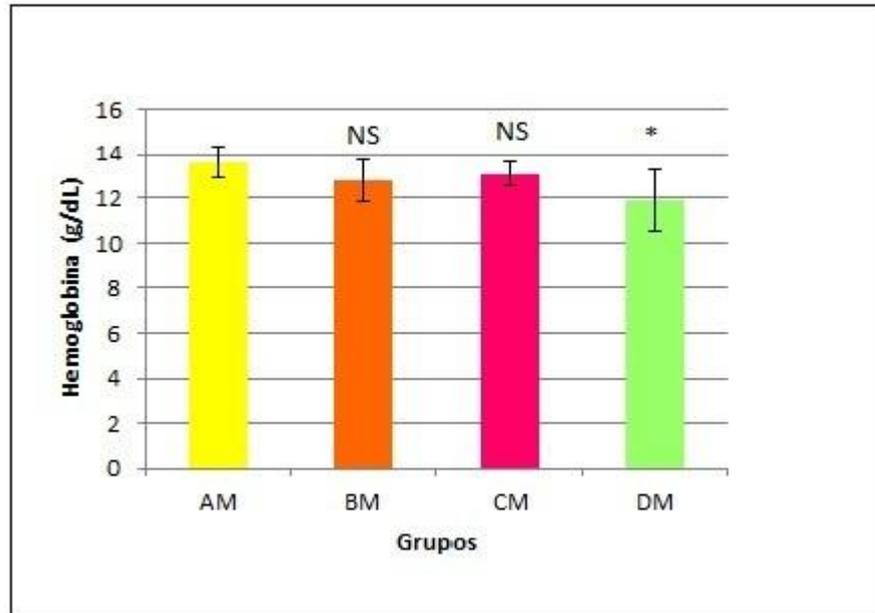


Figura 22: Resultados da contagem de hemoglobina (g/dL) nos animais controle (AM), tratados com EEEp 100 mg/kg (BM), tratados com EEEp 300 mg/kg (CM) e satélite (DM).As colunas representam as Médias e as barras, o Desvio Padrão.

^{NS}Diferença não significativa entre os grupos estudados; ANOVA *One Way/Tukey*.

* $p < 0,05$ em comparação com o grupo controle; ANOVA *One Way/Tukey*.

Uma contagem diminuída de plaquetas, condição chamada de trombocitopenia, pode resultar de uma série de situações patológicas, entre as quais estão: destruição aumentada de plaquetas, devido ao uso de certas drogas; desordens imunes; coagulação vascular disseminada; ou lesões mecânicas às plaquetas (LIMA, et al., 1992).

A discreta trombocitopenia observada no grupo tratado com EEEp 300 mg/kg embora estatisticamente significativa ($p < 0,05$), não tem um significado clínico importante e foi revertida após interrupção do tratamento (Figura 27; Tabela 8). Abalizados em comparações com a literatura é possível perceber que estas alterações, em sua maioria, estão dentro da faixa de variabilidade adotada anteriormente por Diniz (2000), sugerindo que estas alterações não sejam devido a toxicidade causada pelo EEEp.

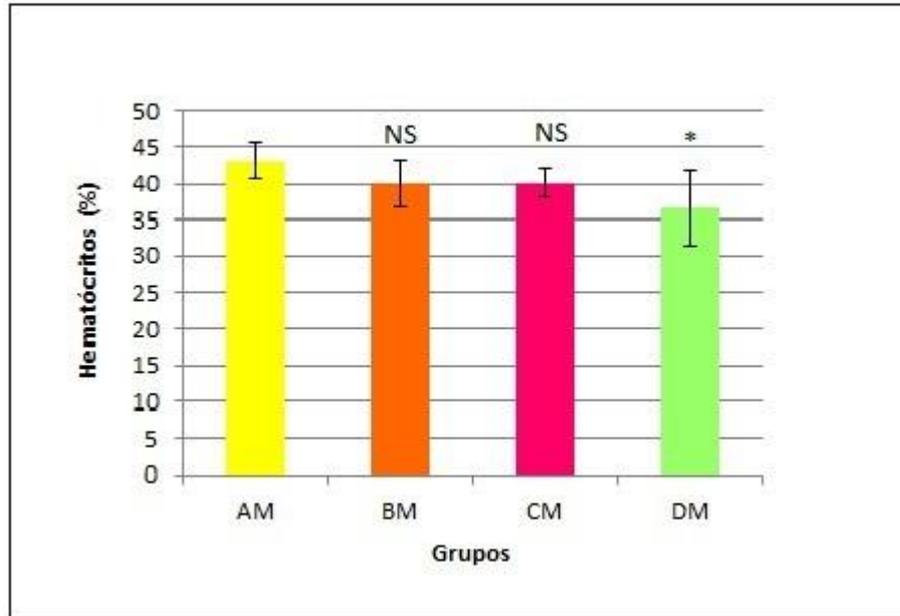


Figura 23: Resultados da contagem de hematócritos (%) nos animais controle (AM), tratados com EEep 100 mg/kg (BM), tratados com EEep 300 mg/kg (CM) e satélite (DM).As colunas representam as Médias e as barras, o Desvio Padrão.

^{NS}Diferença não significativa entre os grupos estudados; ANOVA *One Way/Tukey*.

* $p < 0,05$ em comparação com o grupo controle; ANOVA *One Way/Tukey*

Nos exames macro e microscópico dos órgãos dos animais utilizados no teste de toxicidade subcrônica, os órgãos analisados (cérebro, coração, fígado, pulmões, baço, pâncreas e rins) não apresentaram nenhum tipo de alteração significativa, sem particularidades histológicas.

Como observado nos resultados da análise anátomo e histopatológica do teste de toxicidade aguda, os pulmões revelaram arquitetura lobulares parenquimatosas preservadas, tendo os alvéolos paredes finas com revestimento epitelial habitual por pneumócitos. Nenhum sinal da presença de células envolvidas em processos inflamatórios e líquido no interior dos alvéolos.

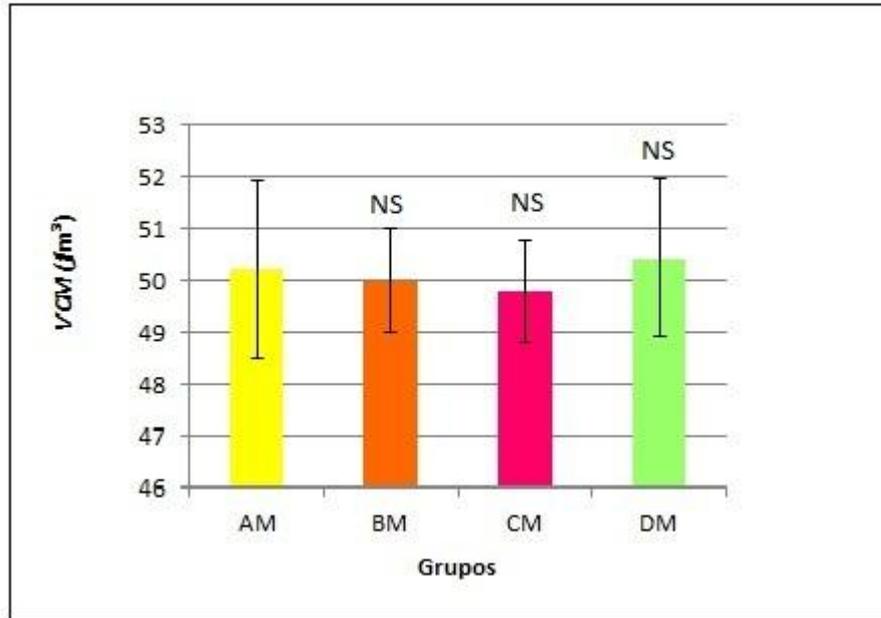


Figura 24: Resultados da determinação do Volume Corpuscular Médio (fm^3) nos animais controle (AM), tratados com EEEp 100 mg/kg (BM), tratados com EEEp 300 mg/kg (CM) e satélite (DM).As colunas representam as Médias e as barras, o Desvio Padrão.

^{NS}Diferença não significativa entre os grupos estudados; ANOVA *One Way/Tuckey*.

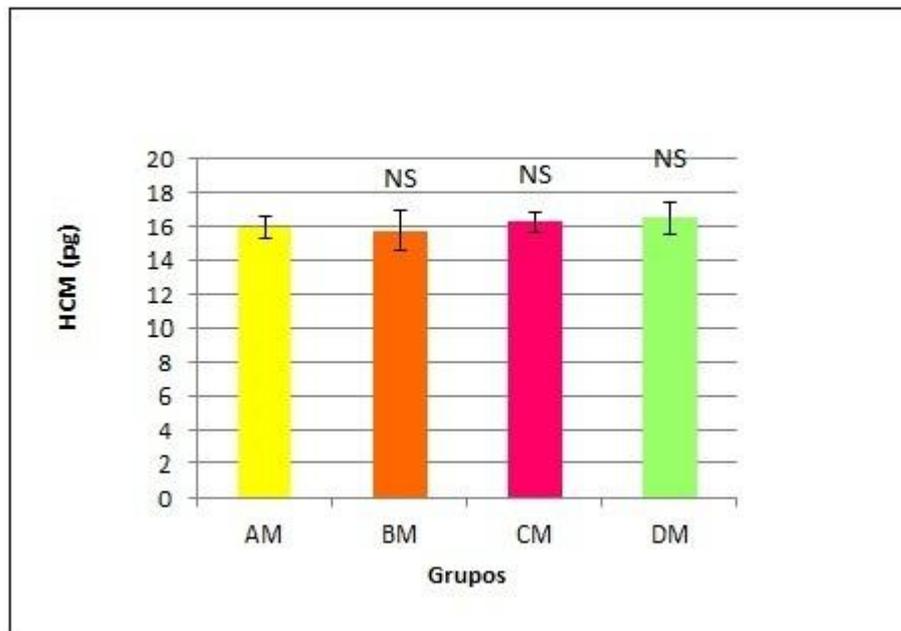


Figura 25: Resultados da determinação da Hemoglobina Corpuscular Média(pg) nos animais controle (AM), tratados com EEEp 100 mg/kg (BM), tratados com EEEp 300 mg/kg (CM) e satélite (DM).As colunas representam as Médias e as barras, o Desvio Padrão.

^{NS}Diferença não significativa entre os grupos estudados; ANOVA *One Way/Tuckey*.

Cérebro e cerebelo apresentaram estruturas celulares normais. Região do cárdia (estômago), com epitélio estratificado e porção glandular sem alterações na estrutura tecidual interior. Um dos segmentos do intestino delgado (íleo) estava estruturalmente normal.

Rins tinham a superfície externa envolvida por cápsula opalescente, que se destaca com facilidade do parênquima. Nas secções seriadas, observa-se superfície compacta, pardacenta, com limites córtico-medulares nítidos e perfeita visualização pirâmides e cálices renais. Cotos ureterais representando remanescentes de amputação proximal. O estudo histológico mostrou arquitetura lobular e “população” glomerular preservadas. Nos glomérulos, tufo capilares e mesângio delicados estavam separados da cápsula de Bowman por espaço de retração artefactual. Não foram observadas lesões fibróticas, hemorrágicas ou áreas de enfarte.

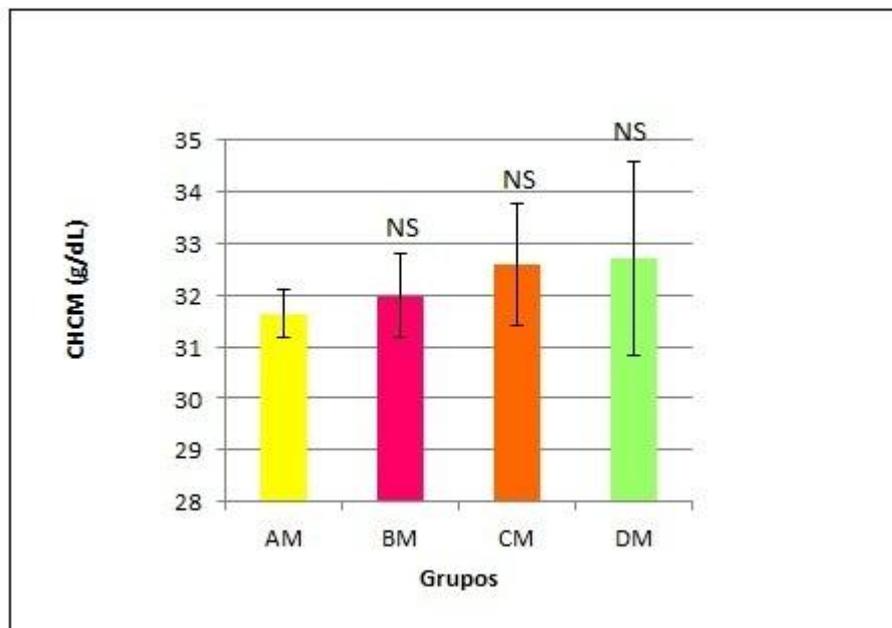


Figura 26: Resultados da determinação da Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (g/dL) nos animais controle (AM), tratados com EEEp 100 mg/kg (BM), tratados com EEEp 300 mg/kg (CM) e satélite (DM).As colunas representam as Médias e as barras, o Desvio Padrão.

^{NS}Diferença não significativa entre os grupos estudados; ANOVA *One Way/Tuckey*.

O coração apresentava-se recoberto por epicárdio fino, transparente e delicadamente vascularizado, vasos da base proporcionais às dimensões do órgão e cavidades átrio-ventriculares revestidas por endocárdio liso e brilhantes sendo ora vazias, ora ocupadas por coágulos sanguíneos (alteração natural *post-mortem*). As válvulas átrio-ventriculares e semilunares (pulmonar e aórtica) tinham bordas livres. Ao exame microscópico, o tecido cardíaco mostrou-se também dentro dos limites da normalidade histológica.

Não houve sinais de inflamação, agregados linfocitários, necrose ou alterações circulatórias no fígado, mas foi observado discreta esteatose macrovesicular em todos os grupos, com pequenos vacúolos limitados às zonas lobulares hepáticas, provavelmente induzidas pela alimentação (este tipo de ração contém um teor maior de gorduras) ou por estresse, causado pela manipulação diária, que induz a liberação de cortisol e adrenalina, mobilizando triglicérides e ácidos graxos, ambos lipídios que são metabolizados principalmente no fígado (KUMAR et al, 2010).

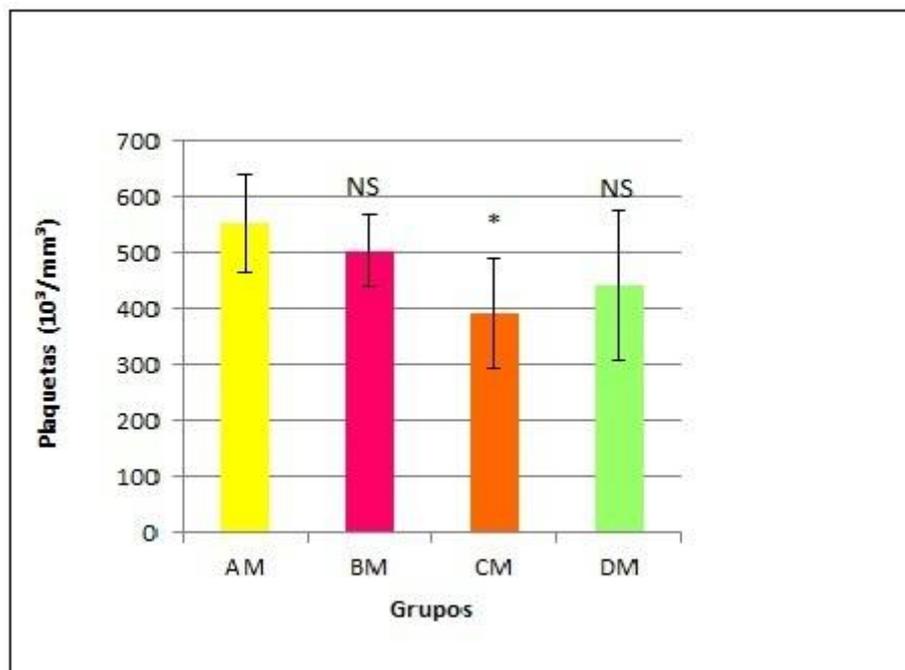


Figura 27: Resultados da contagem de Plaquetas ($10^3/\text{mm}^3$) nos animais controle (AM), tratados com EEEp 100 mg/kg (BM), tratados com EEEp 300 mg/kg (CM) e satélite (DM). As colunas representam as Médias e as barras, o Desvio Padrão.

^{NS}Diferença não significativa entre os grupos estudados; ANOVA *One Way/Tukey*.

* $p < 0,05$ em comparação com o grupo controle; ANOVA *One Way/Tukey*.

Assim, juntamente com os resultados obtidos dos ensaios preliminares de toxicidade e toxicidade aguda, o extrato possui toxicidade muito baixa. Entretanto, cabe ressaltar que um estudo completo da toxicidade subcrônica/crônica, com a avaliação de outros parâmetros, como por exemplo, os bioquímicos, além de estudos específicos de carcinogênese, mutagênese e teratogênese, precisa ser realizado para que o extrato possa ter uma classificação toxicológica que permita segurança no seu uso.

4.7 AVALIAÇÃO DO EXTRATO DE *E. PLICATA* EM MODELO DE MALÁRIA MURINA

Neste estudo, a interrupção da infecção pelo *P. berghei* e a eutanásia dos animais ficaram definidas para o 5º dia de infecção, período em que começam a ocorrer alterações que culminam com as complicações severas da doença em modelo experimental murino (MOREIRA, 2010).

Os resultados da avaliação da parasitemia nos grupos INFECTADOS e TRATADOS são mostrados na Figura 28. Salienta-se que nos animais não infectados, não foi encontrado nenhum parasita nos esfregaços.

No presente trabalho, observou-se uma redução significativa da parasitemia nos animais tratados com a dose de 300mg/kg de EEep ($1,32 \pm 0,45$ %) com os não tratados ($3,34 \pm 1,78$ %). Este resultado indica a presença do efeito antiplasmódico *in vivo* deste extrato, com a presença de componentes químicos capazes de atacar o parasita (uma ação citotóxica direta) ou interferir em algum mecanismo de invasão de eritrócitos. Nenhum animal foi a óbito durante o estudo.

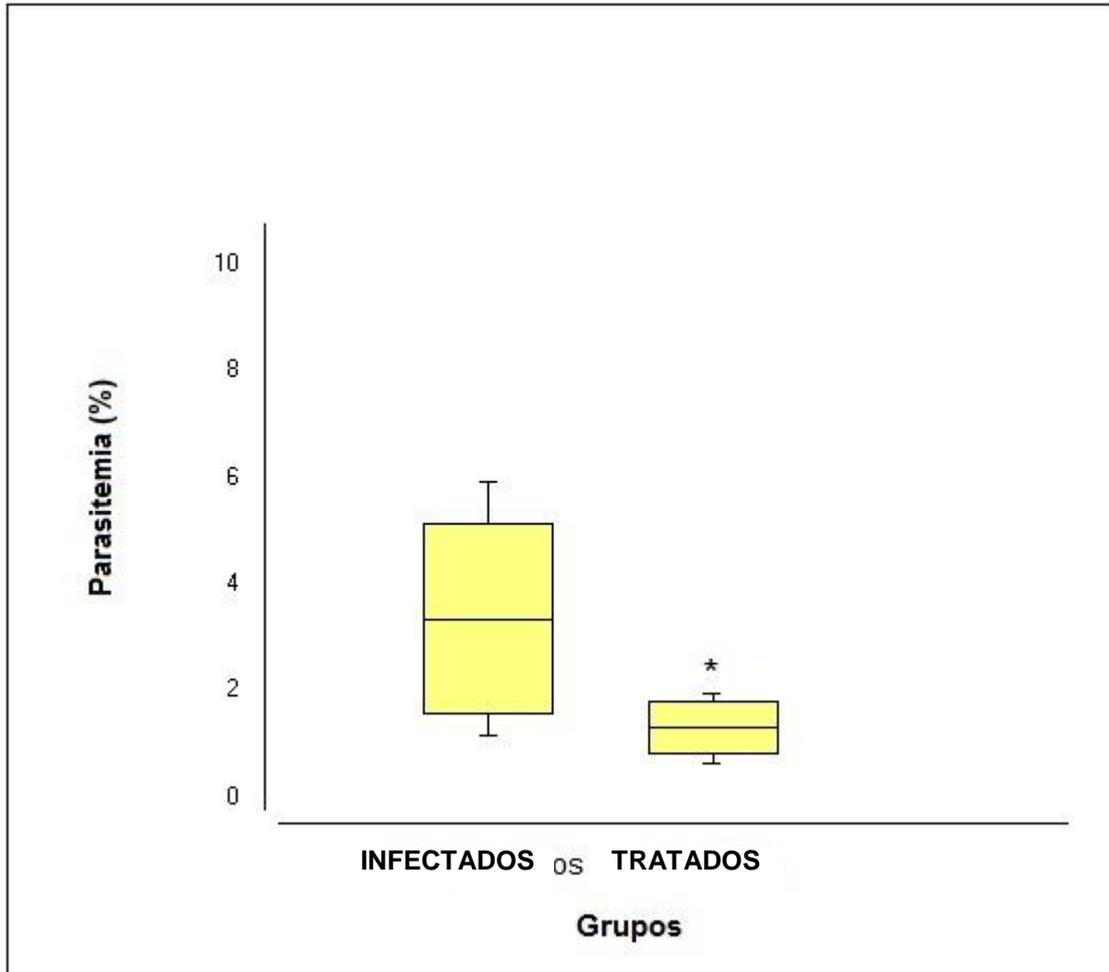


Figura 28: Valores da parasitemia (%) obtidos de camundongos infectados (INFECTADOS) e infectados e tratados com EEEp com as doses de 300 mg/Kg (TRATADOS) no ensaio de malária murina. As colunas representam as médias e as barras, o Desvio Padrão.

* $p < 0,05$ comparado com INFECTADO; teste "t" de Student.

Dentre as complicações que merecem destaque por estarem amplamente associadas à infecção pelo modelo animal proposto no estudo, estão: a malária cerebral e as complicações pulmonares (BOTELHO, 1996; TAYLOR, 2006; PENET, 2007). Os mecanismos que desencadeiam a patogenia da malária e o aparecimento das formas severas não estão completamente elucidados. Portanto, qualquer conhecimento que possa ser útil para o entendimento dos mecanismos envolvidos na patogenia da malária poderá colaborar para o controle da doença (MOREIRA, 2010).

Sabe-se que o *Plasmodium* é susceptível às alterações oxidativas (PABLON 2002), pois a maioria dos antimaláricos utilizadas no combate ao parasita, assim como a própria defesa do hospedeiro, atua via produção de radicais livres (PRADA, 1996; CUI, 2007).

Em contrapartida, o parasita parece responder a estas ações oxidativas por meio de mecanismos antioxidantes próprios, tais como a produção de ácido lipóico e a síntese de vitamina B6 os quais podem, não só, contribuir para o aumento da sobrevivência do parasita (resistência), bem como levar a manifestações severas da doença (SOBOLEWSKI, 2005; TOLER, 2005; WRENGER, 2005).

A ação de algumas substâncias antimaláricas reside na sua capacidade em produzir radicais livres e assim, causar a destruição do parasita. O tratamento com cloroquina, em pacientes portadores de *P. falciparum*, por exemplo, causa diminuição dos níveis plasmáticos de defesas antioxidantes (FAROMBI et al., 2003).

Os resultados das determinações dos parâmetros oxidativos avaliados neste trabalho (MDA e TEAC) nos diferentes grupos estão dispostos na Tabela 9 e nas Figuras 29 a 32.

Tabela 9: Valores dos parâmetros oxidativos obtidos de cérebro e pulmões de animais controle, infectados e infectados e tratados com EEEp na dose de 300 mg/Kg no ensaio de malária experimental murina

Grupos experimentais	Parâmetros Oxidativos			
	MDA Cerebral (ng/mL)	MDA Pulmonar (ng/mL)	TEAC Cerebral (mM/L)	TEAC Pulmonar (mM/L)
CONTROLE	2588,57 ± 546,49	845,08 ± 193,19	10,89 ± 6,45	7,81 ± 3,92
INFECTADOS	2693,52 ± 747,74 ^{NS}	528,03 ± 135,37*	10,30 ± 5,86 ^{NS}	16,88 ± 3,75*
TRATADOS	3721,33 ± 974,80* [#]	793,50 ± 294,38 ^{NS}	9,52 ± 3,87 ^{NS}	11,65 ± 5,49 ^{NS}

Os valores estão expressos em média ± desvio padrão.

*p < 0,05 em comparação com grupo controle; ANOVA *One Way/Tukey*

[#]p < 0,05 em comparação com grupo infectado; ANOVA *One Way/Tukey*

^{NS}Diferença não significativa entre os grupos estudados (p < 0,05); ANOVA *One Way/Tukey*

Um avaliador indireto da extensão da peroxidação lipídica de órgãos e tecidos é a quantificação de produtos formados no processo oxidativo, entre eles, o malondialdeído (MDA), um hidroperóxido gerado durante situações em que as membranas celulares sofrem danos oxidativos gerados por radicais livres (FELLIPE e PERCÁRIO, 1991).

Os resultados da determinação de MDA cerebral (Figura 29) e pulmonar (Figura 30) mostraram que não houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo infectado e controle (MDA cerebral), mas houve uma pequena diminuição deste marcador nos pulmões dos animais infectados. Com relação aos animais tratados com EEEp nas doses de 300 mg/kg, houve um aumento significativo dos níveis de MDA, tanto em relação ao controle quanto em relação aos animais infectados ($p < 0,05$)

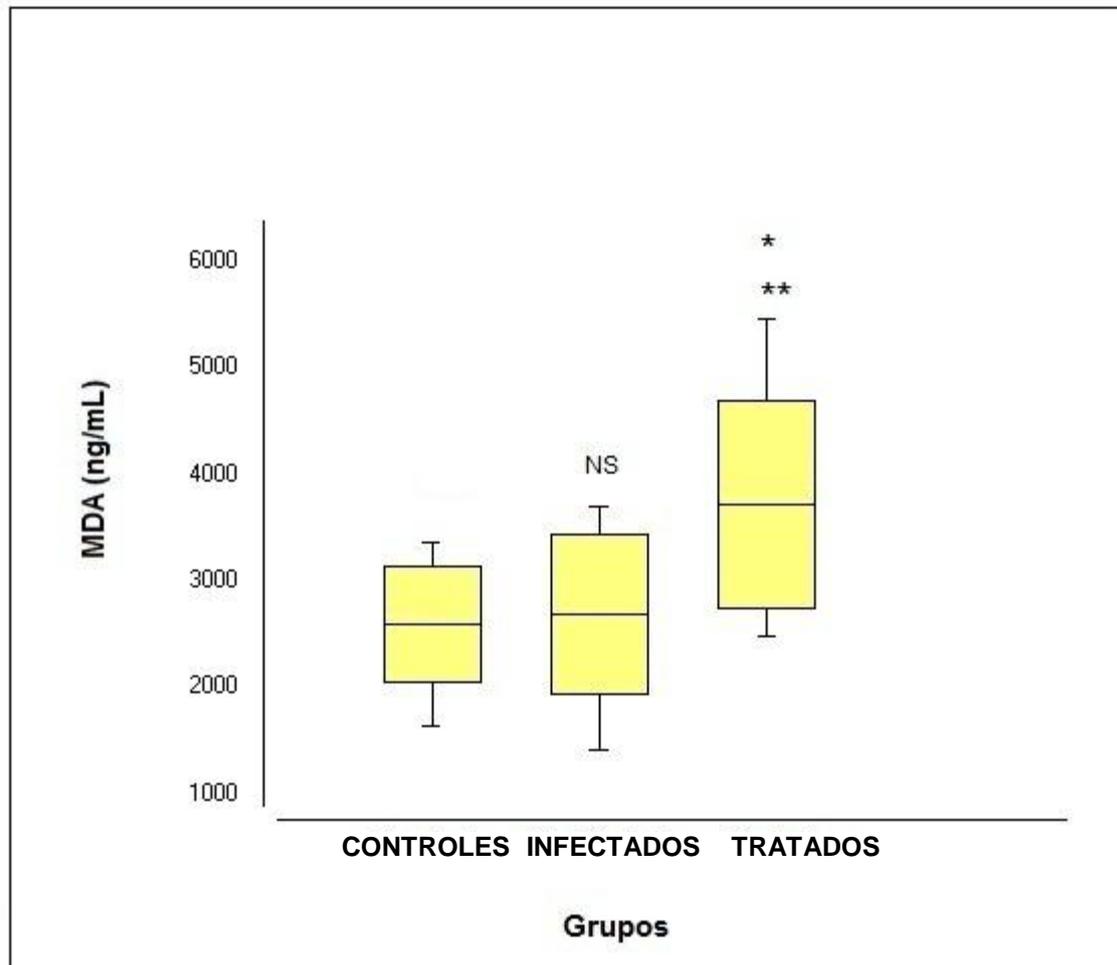


Figura 29: Valores de MDA cerebral (ng/mL) obtidos de animais não infectados (CONTROLE), infectados (INFECTADOS) e infectados e tratados com EEEp com as doses de 300 mg/Kg (TRATADOS) no ensaio de malária murina. As colunas representam as médias e as barras, o Desvio Padrão.

* $p < 0,05$ comparado ao CONTROLE; ANOVA *One Way/Tukey*.

** $p < 0,05$ comparado ao INFECTADO; ANOVA *One Way/Tukey*.

NS Diferença não significativa quando comparado com CONTROLE; ANOVA *One Way/Tukey*.

O cérebro apresenta estrutura e fisiologia muito complexas e um funcionamento competente para manter sua homeostase. O crânio, o liquor e a barreira

hematoencefálica são estruturas que conferem ao órgão proteção contra diversas formas de agressão patológica (KUMAR et al., 2010).

Adicionalmente, o cérebro parece possuir um arsenal antioxidante que o auxiliam no combate a isquemia, composto principalmente por enzimas antioxidantes, bacleína (um flavonóide com capacidade inibidora de lipoxigenase), glutathiona, vitamina E e outras moléculas pequenas (CUDDIHY et al. 2008; VAN LEYEN et al. 2006). Ao que parece, este sistema antioxidante cerebral conseguiu manter constante os níveis de MDA e da capacidade antioxidante total, pelo menos até o 5º dia de infecção.

Já na avaliação da peroxidação lipídica do tecido pulmonar, verifica-se que os níveis do marcador MDA dos animais infectados encontram-se ligeiramente abaixo dos controles e dos animais tratados (Figura 30) enquanto que os níveis da TEAC pulmonar dos infectados encontram-se ligeiramente acima dos níveis dos animais não infectados (Figura 32). Particularmente, na tentativa de combater a elevação na peroxidação lipídica, as células pulmonares sintetizam substâncias antioxidantes que fazem com que as dosagens pulmonares de TEAC aumentem ou diminuam no sentido de reduzir os danos causados pela lipoperoxidação (MOREIRA, 2010).

Os resultados obtidos de MDA cerebral nos animais tratados com doses de 300 mg/kg do extrato parecem apontar para um aumento da ocorrência de peroxidação lipídica cerebral, refletido no aumento nas concentrações de MDA (Figura 29, Tabela 9). Apesar disso, foram encontradas alterações significativas nos resultados da TEAC em nenhum dos grupos (Figuras 31 e 32). Apesar do aumento da peroxidação lipídica cerebral observada nos animais tratados, vale lembrar que o extrato não causou qualquer tipo de alteração histopatológica no cérebro dos animais, na avaliação da toxicidade aguda e subcrônica.

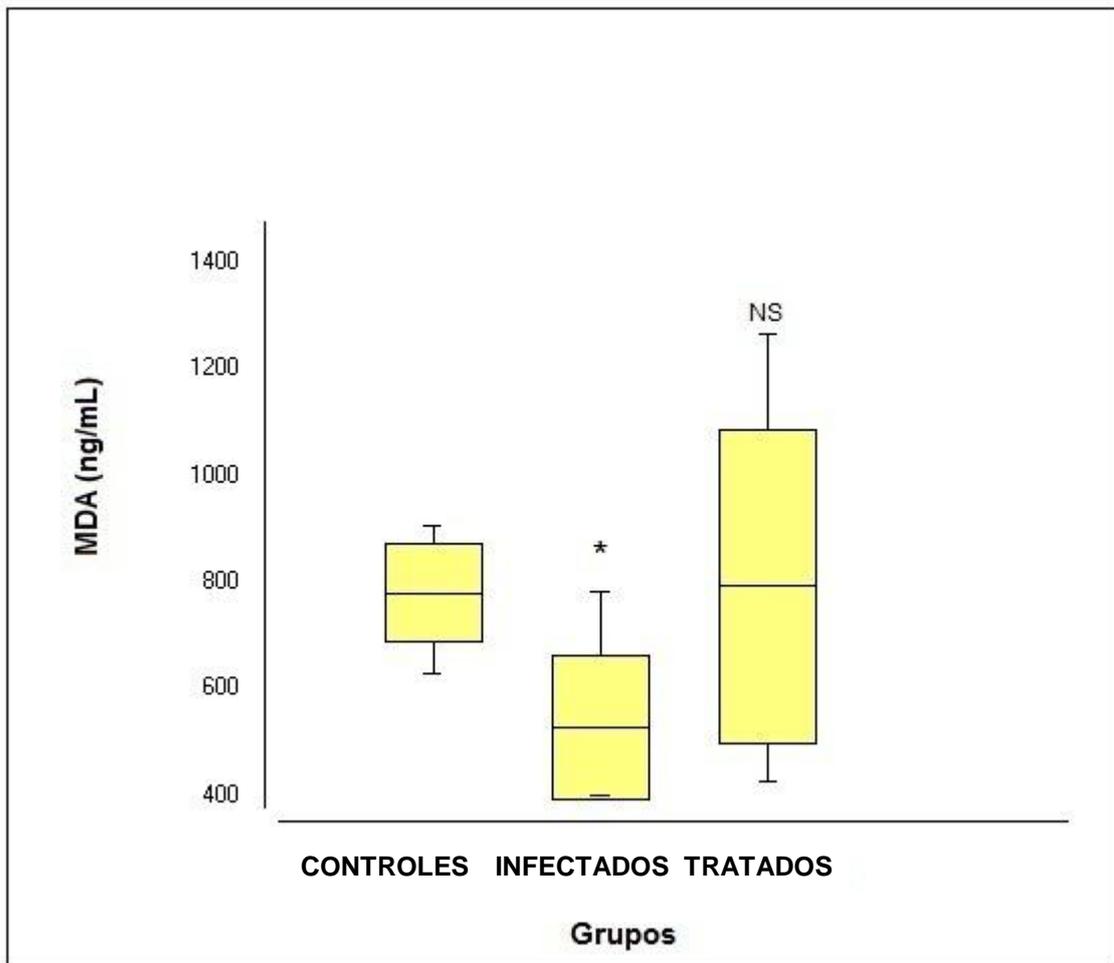


Figura 30: Valores de MDA pulmonar (ng/mL) obtidos de animais controle (CONTROLE), infectados (INFECTADOS) e infectados e tratados com EEEp com as doses de 300 mg/Kg (TRATADOS) no ensaio de malária murina. As colunas representam as médias e as barras, o Desvio Padrão.

* $p < 0,05$ comparado com CONTROLE; ANOVA *One Way*/Tukey.

^{NS} Não significante entre os grupos para $p < 0,05$; ANOVA *One Way*/Tukey.

Esses achados sugerem uma possível atividade pró-oxidante do extrato. A redução da parasitemia nos animais tratados pode estar relacionada com essa possível ação pró-oxidante, e os componentes do extrato cruzam a barreira hematoencefálica, sendo esta a possível razão de não haver ocorrido uma resposta antioxidante inata considerável por parte do hospedeiro.

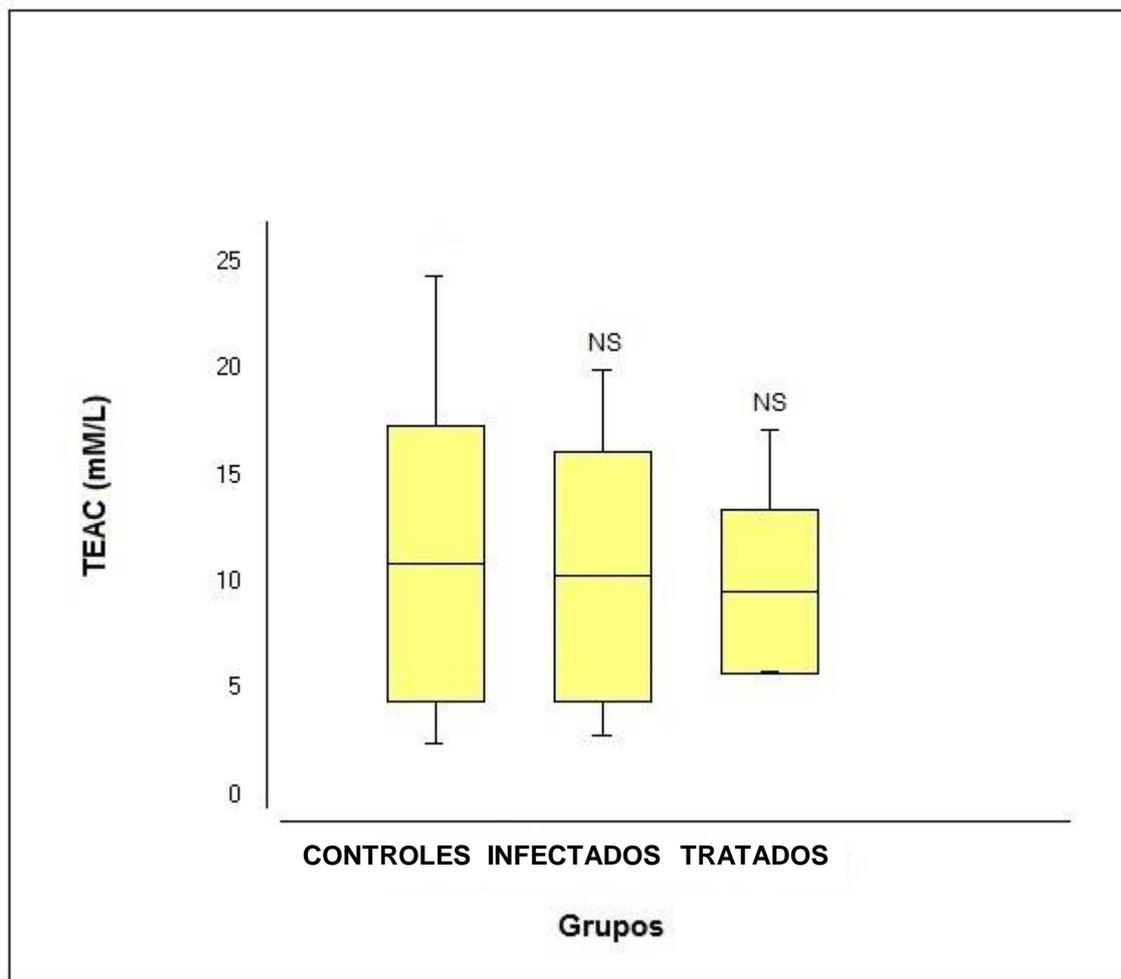


Figura 31: Valores da TEAC cerebral (mM/L) obtidos de animais não infectados (CONTROLE), infectados (INFECTADOS) e infectados e tratados com EEEp com as doses de 300 mg/Kg (TRATADOS) no ensaio de malária murina. As colunas representam as médias e as barras, o Desvio Padrão.

^{NS} Não significante entre os grupos para $p < 0,05$; ANOVA *One Way*/Tukey.

Essa idéia é corroborada pelo fato de que os parasitas da malária são altamente susceptíveis às variações oxidativas, mas também capazes de induzir estresse oxidativo em seus hospedeiros através da produção de ERTON (BERENDT et al, 1990; 1994; CLARK e ROCKETT, 1994; VAN DER HEYDE et al., 2006; BECKER et al., 2004; PINO et al., 2003). Antraquinonas, naftoquinonas e outras quinonas, como a eleuterine e isoeleuterine (HARA et al., 1997; HAN et al., 2008, MALHEIROS, 2008), substâncias que demonstraram estar presentes na composição de algumas espécies do gênero *Eleutherine*, são reconhecidas na literatura como substâncias capazes de induzir o estresse oxidativo através da formação de ERTON (KLAUS et al., 2010; SHI et al., 1994).

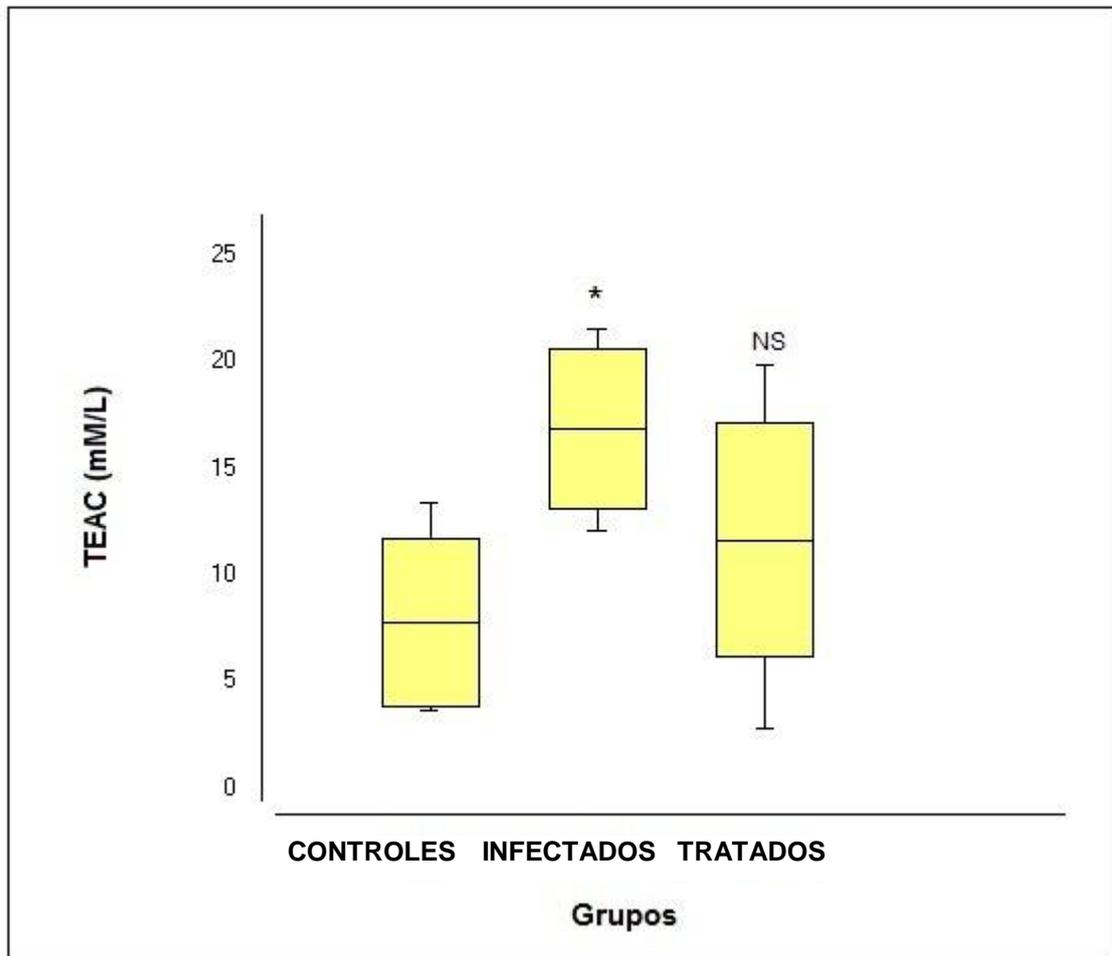


Figura 32: Valores da TEAC pulmonar (mM/L) obtidos de animais não infectados (CONTROLE), infectados (INFECTADOS) e infectados e tratados com EEEp com as doses de 300 mg/Kg (TRATADOS) no ensaio de malária murina. As colunas representam as médias e as barras, o Desvio Padrão.

* $p < 0,05$ comparado com CONTROLE; ANOVA *One Way*/Tukey.

NS Não significante entre os grupos para $p < 0,05$; ANOVA *One Way*/Tukey.

Um importante fármaco antimalárico, a dihidroartemisinina, e outros derivados semi-sintéticos isolados a partir da *Artemisia annua* são capazes de induzir o estresse oxidativo através da diminuição das reservas intracelulares de glutathione, assim como a glutathione peroxidase, favorecendo a morte do parasita (ITTARAT et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2009). Produtos polifenólicos da curcumina, derivada da *Curcuma longa*, tem mostrado um grande potencial no tratamento da malária causada por *P. falciparum*. Tais compostos são capazes de inibir a acetilação de histonas necessárias para a expressão das PfEMPs, de mecanismos geradores de espécies reativas do oxigênio (CUI et al., 2007).

Observa-se, entretanto, que o tratamento com EEEp não alterou os níveis de MDA pulmonar em relação aos demais tratamentos. Na tentativa de evitar o estresse oxidativo, o microambiente pulmonar parece lançar mão de uma complexa maquinaria antioxidante. As substâncias, potencialmente, responsáveis por esse processo são: as proteínas A1, A2 e B, que fazem parte do surfactante alveolar (SAXENA, 2005; BEIN, 2009); as enzimas catalase (CHRISTOFIDOU-SOLOMIDOU, 2003) e superóxido dismutase (OURY, 2002; KINSELLA, 2005); e a glutatona (RAHMAN, 2000).

Os resultados obtidos com a avaliação do tratamento do EEEp em animais infectados com *P. berghei*, permite inferir que a redução da parasitemia pode ter relação com um provável efeito pró-oxidante deste extrato, tanto em função de sua já conhecida composição química, quanto do aumento dos efeitos peroxidativos cerebrais, como disposto acima. Entretanto, é necessária a avaliação de outros parâmetros envolvidos no processo oxidativo, como o NO, para elucidação definitiva dos mecanismos envolvidos neste processo.

Conclusões

5 CONCLUSÕES

Tendo em vista os resultados obtidos neste trabalho, podemos concluir que:

- A análise físico-química parcial da droga vegetal apresentou resultados adequados para realização dos testes subsequentes;
- A abordagem fitoquímica do extrato indicou a presença de classes de metabólitos, como naftoquinonas, com potencial farmacológico para futuros estudos de atividade antimalárica;
- Os resultados das avaliações da citotoxicidade e principalmente o bioensaio em *Artemia salina* Leach, mostraram que o extrato apresenta toxicidade muito baixa;
- O extrato, na dose oral de 5000 mg/kg, não apresentou nenhum sinal evidente de toxicidade em camundongos machos e fêmeas, dentro dos parâmetros avaliados;
- Os resultados da avaliação da toxicidade oral subcrônica demonstraram que houve alterações estatisticamente significantes de alguns parâmetros hematológicos, mas que não foram clinicamente importantes, do ponto de vista toxicológico, corroborando pela ausência de quaisquer alterações anatomo-histopatológicas;
- O extrato, nas doses de 300 mg/kg, reduziu significativamente a parasitemia, mas não alterou os demais parâmetros oxidativos avaliados: TEAC cerebral e pulmonar e MDA pulmonar. Entretanto, houve significativo aumento do MDA cerebral, quando comparado inclusive com os animais infectados, indicando efeito pró-oxidante, dos componentes deste extrato, no cérebro dos animais infectados;
- Os resultados obtidos com a avaliação do tratamento do EEEp em animais infectados com *P. berghei* (malária experimental), permite inferir que a redução da parasitemia pode ter relação com um provável efeito pró-oxidante deste extrato, tanto em função de sua composição química, quanto do aumento da peroxidação lipídica

cerebral, tendo-se em vista a grande susceptibilidade do *Plasmodium* a variações oxidativas e o fato de que alguns fármacos ou substâncias antimaláricas já conhecidas possuem propriedades pró-oxidantes;

- Apesar destes resultados, é necessário a avaliação de outros parâmetros envolvidos no processo oxidativo, como o NO, para elucidação definitiva dos mecanismos envolvidos neste processo.

Referências

6 REFERÊNCIAS

ALVES, M. J. Q. F. Estudos pré-clínicos com plantas medicinais: base para a fitoterapia. In: FERRO, D. **Fitoterapia: conceitos clínicos**. São Paulo, Editora Atheneu, 2006.

ALVES, N.M. **Estudo farmacognóstico e da toxicidade experimental (Aguda e SubAguda) do Guatambú (Aspidosperma subincanum Mart.)**. Dissertação de Mestrado em Ciências da Saúde - Universidade de Brasília, Brasília, 2007. p. 43.

ALVES, T. M. A.; KLOOS, H.; ZANI, C. L. Eleutherione, a novel fungitoxic naphthoquinone from *Eleutheria bulbosa* (Iridaceae). **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 5, p. 709-712, 2003.

ANDRIOLLI, A. C.; SANTOS, D. S.; TEIXEIRA, S. C. G.; TEIXEIRA, L. R.; BERALDO, H.; ZIOLLI, R. L. Avaliação do potencial citotóxico de 2- piridiniformamida tiossemicarbazonas de seus complexos de Fe(III) utilizando *Artemia salina*. **Revista Saúde e Ambiente**, v. 8, n. 2, p. 19-23, 2007

ASSEMI, M. Herbs Affecting the Central Nervous System: Ginkgo, Kava, St. John's Wort, and Valerian. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, v.44, n.4, p.824-835, 2001.

BACHA, W.J.; WOOD, L.M. **Color atlas of veterinary histology**. Ed. Lea & Febiger. 269p. 1990.

BALLA, J.; VERCELLOTTI, G. M.; NATH, K.; YACHIE, A.; NAGY, E.; EATON, J. W.; BALLA, G. Haem, haemoxygenase and ferritin in vascular endothelial cell injury. **Nephrology Dialysis Transplantation**, n. 18, p. 8-12, 2003.

BARROS, S. B. M. e DAVINO, S. C. Avaliação da toxicidade. In: OGA, S. **Fundamentos de Toxicologia**. 2.ed. São Paulo: Ateneu, p.59-67, 2003. 111

BECKER, K.; TILLEY, L.; VENNERTSTROM, J.L.; ROBERTS, D.; ROGERSON, S.; GINSBURG, H. Oxidativestress in malaria parasite-infected erythrocytes: host-parasite interactions. **Int. J. Parasitol.** v. 34, n. 2, p. 163-89, 2004.

BEDNARCZUK, V. O.; VERDAM, M. C. S.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Testes in vitro e in vivo utilizados na triagem toxicológica de produtos naturais. **Visão Acadêmica**, v.11, n. 2, p. 43-50, 2010

BEIN, K.; WESSELKAMPER, S.C.; LIU, X.; DIETSCH, M.; MAJUMDER, N.; CONCEL, V.J.; MEDVEDOVIC, M.; SARTOR, M.A.; HENNING, L.N.; VENDITTO, C.; BORCHERS, M.T.; BARCHOWSKY, A.; WEAVER, T.E.; TICHELAAR, J.W.; PROWS, D.R.; KORFHAGEN, T.R.; HARDIE, W.D.; BACHURSKI, C.J.; LEIKAUF, G.D. Surfactant-Associated Protein B Is Critical to Survival in Nickel-Induced Injury in Mice. **Am J Respir Cell Mol Biol**. v.41, p.226-236, 2009.

BERENDT, A. R.; FERGUSON, D. J.; NEWBOLD, C. I. Sequestration in Plasmodium falciparum malaria: sticky cells and sticky problems. **Parasitol Today**, v.6, n.8, p. 247-254, 1990.

BERENDT, A. R.; TUMER, G. D.; NEWBOLD, C. I. Cerebral malaria: the sequestration hypothesis. **Parasitol Today**, v.10, n.10, p. 412-414, 1994.

BIOT, C.; CHIBALE, K. Novel approaches to antimalarial drug discovery. **Infectious Disorders-Drug Targets**, v. 6, p.173-204, 2006.

BRAGA, E.M. Plasmodium – Malária. In: NEVES, D.P. **Parasitologia Humana**. 11ª ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2005. p. 143.

BRANDÃO, M. G. L. Dossiê Técnico: Produção de chás e extratos de plantas medicinais. 2007. Disponível em: <<http://sbrt.ibict.br/dossie-tecnico/downloadsDT/MTc1>>. Acesso em: 04 nov. 2010.

BRASILEIRO, B. G.; PIZIOLO, V. R.; RASLAN, D. S.; JAMAL, C. M.; SILVEIRA, D. Antimicrobial and cytotoxic activities screening of some Brazilian medicinal plants used in Governador Valadares district. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.42, n. 2, p. 195-202, 2006.

BRITO, A. S. **Manual de ensaios toxicológicos in vivo**. Campinas, SP: Editora da UNICAMP. 1994. 122p.

BOTELHO, C.; SILVA, C.O.S.; BEPPU, O.S.; BOGOSSIAN, M.; VARGAFTIG, B.B. Pulmonary edema in murine malaria: modulation by cetirizine. **J Pneumol.** v.22, n.2, p.69-76, 1996.

BOTHAM, P. A. Acute systemic toxicity. **ILAR JOURNAL**, v. 43, Suppl:S, p. 277-281, 2003.

CLARK, I.A.; COWDEN, W.B. The pathophysiology of falciparum malaria. **Pharmacol.Ther.**, v. 99, p. 221-260, 2003.

CLARK, I. A.; ROCKETT, K. A. The Cytokine Theory of Human Cerebral Malaria. **Parasitol Today**, v. 10, n. 10, p. 410-412, 1994.

CHIKAWATA, C. B.; HEMMER, C. J.; DIETRICH, M. High levels of inducible nitric oxide synthase mRNA are associated with increased monocyte counts in blood and have a beneficial role in Plasmodium falciparum malaria. **Infection and Immunity**, v. 68, n.1, p. 394-399, 2000.

COSTA, E. S. S.; DOLABELA, M. F.; OLIVEIRA, D. J.; POVOA, M. M.; MÜLLER, A. H.; Estudo farmacognóstico, toxicidade em Artemia salina e atividade antiplasmódica do extrato etanólico e frações de Montrichardia linifera. In: Reunião Annual da Sociedade Brasileira de Química, 31. **Sociedade Brasileira de Química**. 2009.

CUDDIHY, S.L.; ALI, S.S.; MUSIEK, E.S.; LUCERO, J.; KOPP, S.J.; MORROW, J.D.; DUGAN, L.L. Prolonged α -Tocopherol Deficiency Decreases Oxidative Stress and Unmasks α -Tocopherol-dependent Regulation of Mitochondrial Function in the Brain. **J Biol Chem.** v.283, n.11, p.6915-6924. 2008

CHRISTOFIDOU-SOLOMIDOU, M.; SCHERPEREEL, A.; WIEWRODT, R.; NG, K.; SWEITZER, T.; ARGUIRI, E.; SHUVAEV, V.; SOLOMIDES, C.C.; ALBELDA, S.M.; MUZYKANTOV, V.R. PECAM-directed delivery of catalase to endothelium protects against pulmonary vascular oxidative stress. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.** v.258, p.283-292, 2003.

CUI, L.; MIAO, J.; CUI, L. Cytotoxic Effect of Curcumin on Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*: Inhibition of Histone Acetylation and Generation of Reactive Oxygen Species. **Anyimicrob Agents Chemother.** v.51, n.2, p.488-494, 2007.

DINIZ, M.F.F.M. **Estudos de toxicidade pré-clínica de extratos de folhas de *Cissampelos sympodialis* Eich.** Tese de Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais, Universidade Federal da Paraíba. 147 p. 2000.

DOLABELA, M. **Triagem *in vitro* para a atividade antitumoral e anti- *T. cruzi* de extratos vegetais, produtos naturais e substancias sinteticas.** Belo Horizonte. *Dissertação (Mestrado)* – Universidade Federal de Minas Gerais, 1997. 128p.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4ª ED. 1988.

FAROMBI, E.O.; SHYNTUM, Y.Y.; EMEROLE, G.O. Influence of chloroquine treatment and Plasmodium falciparum malaria infection on some enzymatic and non-enzymatic antioxidant defenses indices in humans. **Drug Chem Toxicol.** v.26, n.1, p.5-71, 2003.

FELLIPE, Jr., J. & PERCÁRIO, S. Radicais livres em medicina intensiva. **Rev. Brás. Terap. Int.**, v. 3, n. 6, p. 66-72, 1991.

FIDOCK, D.A.; ROSENTHAL, P.J.; CROFT, S.L.; BRUN, R.; NWAKA, S. Antimalarial drug discovery: efficacy models for compound screening. **Nature Rev Drug Discovery.** v. 3, p.509–520, 2004.

FRANÇA, R. C. C.; SANTOS, M. G.; FIGUEROA-VILLAR, J. D. Malária: aspectos históricos e quimioterápicos. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1271-1278, 2008.

GORINA, A.L. **A clínica e o laboratório.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 12ª ed. 1984.

HAN, A.; MIN, H.; NAM, J.; LEE, N.; WIRYAWAN, A.; SUPRAPTO, W.; LEE, K. R.; SEO, E. Identification of a new naphthalene and its derivatives from the bulb of *Eleutherine Americana* with inhibitory activity of lipopolysaccharide-induced nitric oxide production. **Chem Pharm Bull**, v. 56, n. 9, p. 1314-1316, 2008.

HARA, H.; MARUYAMA, N.; YAMASHITA, S. HAYASHI, Y.; LEE, K. BASTOW, K. F.; CHAIRUL; MARUMOTO, R.; IMAKURA, Y. Elecanacin, a novel new naphthoquinone from the bulb of *Eleutherine Americana*. **Chem. Pharm. Bull.** v. 45, n. 10, p. 1714-1716, 1997.

IFESAN, B. O. T.; JOYCHARAT, N.; VORAVUTHIKUNCHAI, S. P. The mode of antistaphylococcal action of Eleutherine Americana. **Immunol Med Microbial**, v. 57, p. 193-201, 2009.

INTERAGENCY COORDINATING COMMITTEE ON THE VALIDATION OF ALTERNATIVE METHODS (ICCVAM). **Test Method Protocol for BALB/c 3T3 Neutral Red Uptake Cytotoxicity Assay Phase III**. The National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, 2003.

ITTARAT, W.; SREEPAIN, A.; SRISARIN, A.; PATHEPCHOTIVONG, K. Effect of dihydroartemisinina on the antioxidant capacity of *P. falciparum*-infected erythrocytes. **Southeast Asian J. Trop. Med. Public. Health**. v.34, n.4, p.744-750, 2003.

JINZHONG, X.; FENG, Q.; WENJUAN, D.; GEXIA, .NET bioactive constituents from Eleutherine Americana. **Front Chem China**, n. 3, p. 320-323, 2006.

JOHN, C. C.; PANOSKALTSIS-MORTARI, A.; OPOKA, R. O.; PARK, G. S.; ORCHARD, P. J.; JUREK, A. M.; IDRO, R.; BYARUGABA, J.; BOIVIN, M .J. Cerebrospinal Fluid Cytokine Levels and Cognitive Impairment in Cerebral Malaria. **Am J Troop Med Hug.**, v. 78, n. 2, p.198-205, 2008.

KINSELLA, J.P.; PARKER, T.A.; DAVIS, J.M.; ABMAN, S.H. Superoxide Dismutase Improves Gas Exchange and Pulmonary Hemodynamic in Premature Lambs. **AM J Respira Cria Cair Med**. v.172, p.745-749, 2005.

KLAASSEN, CD Princípios de toxicologia e tratamento do envenenamento. In: GOODMAN & GILMAN. **As bases farmacológicas da terapêutica**. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 11^a ed. 2006.

KLAUS, V.; HARTMANN, T.; GAMBINI, J.; GRAF, P.; STHAL, W.; HARTWIG, A.; LOTZ, L.; 1,4-Naphtoquinones as inducers of oxidative damage and stress signaling in Hecate human keratinocytes. **Archieves of Biochemistry and Biophysics**, v. 496, p. 93-100, 2010.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. ASTER, J. C. **Robbins & Cotran Patologia – Bases patológicas da doença**. 8ª Edição. Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2010. P. 33-34.

KUSUMA, I.W.; ARUNG, E.T.; ROSAMAH, E.; PURWATININGSIH, S.; KUSPRANDINI, H.; SYAFRIZAL; ASTUTI, J.; KIM, Y.; SHIMIZU, K. Antidermatophyte and antimelanogenesis compound from *Eleutherine Americana* grown in Indonesia. **J Nat Medn**, v. 64, p. 223-226, 2010.

LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H.A.; KANIG, J.L. **Teoria e Prática na Industria Farmacêutica**. 1 ed. Lisboa, Fundação Kalouste Gulbenkian. 2001.

LEE, S. E.; KIMB, M. R; KIMB, J. H. Antimalarial activity of anthothocol derived from *Khaya anthotheca* (Meliaceae). **Phytomedicine**, 2007.

LIMA, C. M. B. L. **Avaliação da toxicidade aguda e crônica do extrato hidroacoólico das folhas de *Cissus sicyoides* L.** Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos da Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa. 2007. 108p.

LIMA, L.R.P., OLIVEIRA, T.T., NAGEM, T.J. Efeitos do flavonóide quercetina e dos corantes bixina e norbixina sobre parâmetros sanguíneos de coelhos. **Revista de Nutrição**, v.16 n.3 p.305-314, 2003. 115.

LIMA et al.; **Métodos de laboratório aplicados à clínica: técnica e interpretação**. 7ª. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992.

LIMA, et al. Efeito da colestase nos aspectos funcionais e morfológicos renais após nefrectomia. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.54, n.6, p.513-516, 2008.

LIMSUWAN, S.; VORAVUTHIKUNCHAI S. P. *Boesenbergiapandurata* (Roxb.)Schltr.,*eleutherine Americana* Merr. And *Rhodomyrtustomentosa* (Aiton) Hassak. As antibiofilm producing and antiquorum sensing in *Streptococcuspyogenes*. **Immunol Med Microbiol**, v. 53, p. 429-436, 2008.

LIST, P. H.; SCHMIDT, P. C. **Phytopharmaceutical Technology**, Florida: CRC Press. 2000.

LORENZI, H; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais do Brasil – Nativas e Exóticas**. São Paulo: Instituto Plantarium de Estudo da Flora LTDa. 2002.p. 233-234.

LUSE, S. A.; MILLER, L. H. *Plasmodium falciparum* Malaria: Ultrastructure of Parasitized Erythrocytes in Cardiac Vessels. **Am J Trop Med Hyg.**, v. 20, n. 5, p. 655-660, 1971.

MAFRA, D., ABDALLA, D.S.P., COZZOLINO, S. M. F. Peroxidação lipídica em pacientes com insuficiência renal crônica. **Rev. Nutr.**, v. 12, n. 3, 1999.

MALHEIROS, L. C. S. **Isoeleuterol e isoeleuterina: potenciais marcadores químicos da tintura de Eleutherine plicata Herb (Iridaceae) e atividades microbiológica e antioxidante**. 2009. 68 f. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará, Belém, 2008.

MALONE, M. H.; ROBICHAUD, R.C.The Pharmacological Evaluation of Natural Products – General and Specific Approaches to Screening Ethnopharmaceuticals.**J. Ethnopharmacol.**, v. 8, p.127-147, 1983.

MATOS, F. J. A. Introdução à fitoquímica experimental. 2ª ed. Fortaleza: Universidade federal do Ceará, 1997.141 p.

MCLAUGHLIN, J. L.; ROGERS, L. L.; ANDERSON, J. E. The use of biological assays to evaluate botanicals. **Drug Information Journal**, v. 32, p. 513-524, 1998.

MEYER, B. N.; FERRIGINI, N. R.; PUTNAN, J. E., JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; MCLAUGHLIN, J. L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plants constituents.**Planta Med**, v. 45, p. 31, 1982.

MILLER, O. **Laboratório para o clínico**. Rio de Janeiro: Editora Atheneu 8ª ed., 1999.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, BRASIL. Malária 2008. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=21400>.

MINISTÉRIO DA SAÚDE – SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Guia de Vigilância Epidemiológica. 2005. Disponível

em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/malaria_gve.pdf>. Acessoem: 20 jun 2010.

MOHAMAD, K; HIRASAWA, Y; LITAUDON, M; AWANG, K; HADI, H, A; TAKEYA, K; EKASARI, W; WIDYAWARUYANTI, A; ZAINI, N, C; MORITA, H. Ceramicines B–D, new antiplasmodial limonoids from *Chisocheton ceramicus*. **Bioorganic & Medicinal Chemical** v. 17, p. 727–730, 2009.

MOREIRA, D. R. **Perfil oxidativo na malária experimental**. 2010. 116 f. Dissertação (Mestrado em Patologia das doenças tropicais – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará, Belém, 2010.

MOSMANN, T. Rapid colorimetry assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MÜLLER, S. Redox na antioxidant systems of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Molecular Microbiology**, v. 53, n. 5, p. 1291 – 1305, 2004.

OGA, S. **Fundamentos da Toxicologia**. São Paulo: Atheneu, 1996. 515 p.

OLIVEIRA, A. B.; DOLABELA, M. F.; BRAGA, F. C.; JÁCOME, R. L. R. P.; VAROTTI, F. P.; PÓVOA, M. M. Plant-derived antimalarial agents: new leads and efficient phytochemicals. Part I. Alkaloids. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.81, n. 4, p. 715 – 740, 2009.

OLIVEIRA NETO, A. R.; PINTO, M. A.; SILVA, I. R.; MORAES, S. C.; GOMES, M. L. O uso de *Eleutherine plicata* no tratamento de doenças gastrointestinais na Amazônia paraense. In: CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL, 8 ., 2007, Caxambu. **Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil** Caxambu: Sociedade de Ecologia do Brasil, 2007. p. 1-2.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). **Acute Oral Toxicity – Fixed Dose Procedure**. OECD guideline for testing of chemicals, n. 420. Adopted: 17th December 2001.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). **A Repeated dose 28-day oral toxicity study in rodents.** OECD guideline for testing of chemicals, n. 407. Adopted: 3 October 2008.

OURY, T.D.; SCHAEFER, L.M.; FATTMAN, C.L.; CHOI, A.; WECK, K.E.; WATKINS, S.C. Depletion of pulmonary EC-SOD after exposure to hyperoxia. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.** v.283, p.L777-L784, 2002.

PABLÓN, A.; CARMONA, J.; BURGOS, L.C.; BLAIR, S. Oxidative stress in patients with non-complicated malaria. **Biochem. J.**, v. 368, n. 3, p. 761-768, 2002.

PARAMAPOJN, S.; GANZERA, M.; GRITSANAPAN, W.; STUPPNER, H. Analysis of naphthoquinonederivates in the asian medicinal plant *Eleutherine americana* by RP-HPLC e LC-MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 47, p. 990-993, 2008.

PENET, M.F.; KOBER F.; CONFORT-GOUNY, S.; LE FUR, Y.; DALMASSO, C.; COLTEL N.; LIPRANDI, A.; GULIAN, J.M.; GRAU, G.E.; COZZONE, P.J.; LE VIOLA, A. Magnetic Resonance Spectroscopy Reveals an Impaired Brain Metabolic Profile in Mice Resistant to Cerebral Malaria Infected with *Plasmodium berghei* ANKA. **J Biol Chem.** v.282, n.19, p. 14505-14514, 2007.

PERCÁRIO, S. **Alterações oxidativas e da defesa antioxidante no broncoespasmo agudo induzido em cobias.** São Paulo. 2000. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, 2000.

PERCÁRIO, S. Prevenção de Aterosclerose com Suplementos Antioxidantes. São José do Rio Preto. Tese (Livre-Docente em Ciências Biológicas) – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, 2008.

PETTERSSON, F.; VOGT, A. M.; JONSSON, C.; MOK, B. W.; SHAMAEI-TOUSI, A.; BERGSTRO, S.; WAHLGRENI, M. Whole-Body Imaging of Sequestration of *Plasmodium falciparum* in the Rat. **Infect Immun.**, v. 73, n. 11, p. 7736-7746, 2005.

PHIRI, H.; MONTGOMERY, J.; MOLYNEUX, M.; CRAIG, A. **Competitive endothelial adhesion between plasmodium falciparum isolates under physiological flow conditions.** **Malar J.**, v. 8, p. 214 - 219, 2009.

PINO, P.; VOULDOUKIS, I.; DUGAS, N.; HASSANI-LOPPION, G.; DUGAS, B.; MAZIER, D. Redox-dependent apoptosis in human endothelial cells after adhesion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 10, n. 10, p.582-586, 2003.

PIVETTA, O. Nascimento de uma nova molécula. 2004. Disponível em: http://www.cfww.org/pub/portuguese/cfwnl/4/1102/Nascimento_de_uma_nova_mol%C3%A9cula, acesso em: 10/05/2011.

POSTMA, N. S.; MOMMERS, E. C.; ELING, W. M. C.; ZUIDEMA, J. Oxidative stress in malária; implication for prevention and therapy. **Pharm World Sci.**, v. 4, n. 18, p. 121-129, 1996.

PRADA, J.; MÜLLER, S.; BIENZLE, U.; KREMSNER, P.G. Upregulation of reactive oxygen and nitrogen intermediates in *Plasmodium berghei* infected mice after rescue therapy with chloroquine or artemether. **J Antimicrob Chemother.** v.38, p.95-102, 1996.

RAHMAN, I.; MACNEE, W. Oxidative stress and regulation of glutathione in lung inflammation. **Eur Respir J.** v.53, p.534-554, 2000.

REPETTO, G.; REPETTO, M. **Toxicologia Avanzada**. Capítulo 2: Métodos Alternativos: estudios toxicológicos in vitro. Madrid: Ediciones Días de Santos. 1995. p. 37 – 45.

RIBEIRO, C. C. **Avaliação e identificação da toxicidade aguda e crônica do light-stick, sinalizador utilizado em pesca de espinhel, através de ensaios com diferentes organismos marinhos**. 2010. Trabalho de conclusão de curso. Bacharel em Oceanografia. Santos, 2010.

ROGERO, S. O.; LUGAO, A. B.; IKEDA, T. I.; CRUZ, A. S. Teste *in vitro* de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, v. 6, n. 3, p. 317-320, 2003.

SÁ, M. F. C. P. **Avaliação da toxicidade pré-clínica do extrato hidroalcoólico bruto das folhas de *Costus spicatus* Swartz**. 2008, 118f. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

SAXENA, S.; KUMAR, R.; MADAN, T.; GUPTA, V.; MURALIDHAR, K.; SARMA, P.U. Association of Polymorphisms in Pulmonary Surfactant Protein A1 and A2 Genes With High-Altitude Pulmonary Edema. **Chest**. v.128, n.3, p.1611-1619, 2005.

SHI, M. M.; KUGELMAN, A.; IWAMOTO, T.; TIAN, L.; FORMAN, H. J. Quinone-induced oxidative stress elevate glutathione and induces γ -glutamylcysteine activity in rat lung epithelial L2 cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 42, p. 26512-26517, 1994.

SIXEL, P.J.; PECINALLI, N.R. Características farmacológicas gerais das plantas medicinais. **Infarma**, v.16, p.13-14, 2005.

SOBOLEWISKI, P.; GRAMAGLIA, I.; FRANGOS, J.A.; INTAGLIETA, M.; HEYDE, H.V. *Plasmodium Berghei* resists killing by reactive oxygen species. **Infect Immun**. v.73, n.10, p.6704-6710, 2005.

SONG, S.H.; MIN, H.Y.; HAN, A.R.; NAM, J.W.; SEO, E.K.; PARK, S.W.; LEE, S. H.; LEE, S.K. Suppression of inducible nitric oxide synthase by (-)-isoeleutherin from the bulbs of *Eleutherine americana* through the regulation of NF- κ B activity. **Intrnational Immunopharmacology**, v. 9, p. 298 – 302, 2009

SORGELOS, P.G.; PERSOONE, M.; BAEZA-MESA, E.; BRUGGEMAN, E.. The use of *Artemia* cysts in aquacultures: the concept "hatching efficiency" and description of a new method for cyst processing. P. 715-721. In: Proc. 9th **Annual Meeting World Mariculture Society**. Avault J.W. Jr (Ed.) Louisiana State University, Baton Rouge, LA, USA. 807 p., 1978.

SPIELMANN, H.; GENSCHOW, M.; LIEBSCH, M.; HALLE, W., Determination of the starting dose for acute oral toxicity (LD50) testing in the up and down procedure (UDP) from cytotoxicity data. **Alternatives to Laboratory Animals**. v. 27, p. 957-966, 1999.

TAYLOR, W.R.; CANON, V.; WHITE, N.J. Pulmonary manifestations of malaria: recognition and management. **Treat Respir Med**. v.5, n.6, p.419-428, 2006.

TOLER, S. The plasmodial apicoplast was retained under evolutionary selective pressure to assuage of blood stage oxidative stress. **Med Hypotheses**. v.65, n.4, p.683-690, 2005.

TUROLLA, M.S.R.; NASCIMENTO, E.S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v.42, n.2, p.199-306, 2006.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS. Biotério Central. Camundongos. Disponível em: <http://bioterio.ufpel.edu.br/especies_arquivos/Camundongos.pdf>. Acesso em: 28 nov. 2011.

VALADARES, M. C. Avaliação de toxicidade aguda: estratégias após a “Era do Teste DL₅₀”. **Revista Eletronica de farmácia**, v. 3, n. 2, p. 93-98, 2006.

VAN DER HEYDE HC, NOLAN J, COMBES V, GRAMAGLIA I, GRAU GE. A unified hypothesis for the genesis of cerebral malaria: sequestration, inflammation and hemostasis leading to microcirculatory dysfunction. **Trends Parasitol**, v.22, n.11, p 503-508,2006.

VAN DEN HEUVEL, M J, D G CLARK, R J FIELDER, P P KOUNDAKJIAN, G J A OLIVER, D PELLING, N J TOMLINSON, A P WALKER . The international validation of a fixed-dose procedure as an alternative to the classical LD50 test, **Fd. Chem. Toxicol.**, 28:469-482, 1990.

VAROTTI, F.D., BOTELHO, A.C.C.; ANDRADE, A.A.; DE PAULA, R.C., FAGUNDES, E.M.S.; VALVERDE, A.; MAYER, L.M.U.; MENDONCA, J.S.; SOUZA, M.V.N.; BOECHAT, N.; KRETTLI, A.U. Synthesis, antimalarial activity, and intracellular targets ofMEFAS, a new hybrid compound derived from mefloquine and artesunate. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 52, p.3868–3874, 2008.

VASCONCELOS, T. H. C. **Ensaio toxicológicos pré-clínicos e clínicos com as folhas de Cissus sicyoides L. (VITACEAE)**. Tese de Doutorado em Produtos Naturais Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa , 2004. 118

VEIGA, L. F. Avaliação da faixa de sensibilidade de Artemia salina ao laurel sulfato de sodio. Rio de Janeiro. PETROBRAS/CENPES/SUPESQ/DITER, 64 p. Projeto de Pesquisa. 1989.

VEIGA, V.F.J.; ANGELO, C. P. Plantas medicinais: Cura segura? **Química nova**, v.28, p. 519-528, 2005.

WHITE, N.J. Qinghaosu (Artemisinin): The price of success. **Science**, v. 320, n. 5874, p. 330–334, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). 10 facts on malaria. Disponível em: <http://www.who.int/features/factfiles/malaria/malaria_facts/en/index.html>. Acesso em: 04 nov 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), World Malaria Report 2011, 2011.

WRENGER, C.; ESCHBACH, M.L.; MÜLLER, I.B.; WARNECKE, D.; WALTER, R.D. Analysis of vitamin B6 biosynthesis pathway in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **J Biol Chem**. v.80, n.7, p.5242-5248, 2005.

WRIGHT, C. W. Recent development in research on terrestrial plants used for the treatment of malária. **Natural Products Report**, V. 27, p. 961-968, 2010.

Anexos

7.1 ANEXO I



Parecer de Aprovação Nº 014/2010/CEPAN/IEC/SVS/MS
Registro CEPAN - 045/2009

Ananindeua/PA, 02 de agosto de 2010.

Projeto: **“Contribuição para a ampliação do conhecimento acerca de plantas medicinais da RENISUS”.**

Pesquisador Responsável: MARIA FANI DOLABELA

Conforme decisão do Comitê de Ética em Pesquisa com Animais-CEPAN do Instituto Evandro Chagas, cientificamos que o projeto acima **foi aprovado**.

Recomendamos ao coordenador responsável que mantenha atualizados todos os documentos pertinentes ao projeto.

Os relatórios parciais deverão ser encaminhados a este Comitê, anualmente, a partir do início do projeto.

Atenciosamente,


NELSON ANTONIO BAILÃO RIBEIRO
Coordenador do CEPAN/IEC

