UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE
E BIOTECNOLOGIA DA REDE BIONORTE

ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADE ANTIMALÁRICA DE *Carapichea ipecacuanha* (BROT.) L. ANDERSON – (*Rubiaceae*)

CHRISTIAN NERI LAMEIRA

BELÉM – PARÁ
2023

CHRISTIAN NERI LAMEIRA

ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADE ANTIMALÁRICA DE *Carapichea ipecacuanha* (BROT.) L. ANDERSON – (*Rubiaceae*)

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia - Rede BIONORTE, no Instituto Evandro Chagas, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Biodiversidade e Biotecnologia.

Orientadora: Dra. Giselle Maria Rachid Viana.
Coorientadora: Profa. Dra. Maria Fani Dolabela

BELÉM – PARÁ
MARÇO/2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

N445e NERI LAMEIRA, CHRISTIAN.
ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADE ANTIMALÁRICA DE Carapichea ipecacuanha (BROT.) L. ANDERSON (Rubiaceae) / CHRISTIAN NERI LAMEIRA. — 2023.
144 f. : il. color.

Orientador(a): Profª. Dra. Giselle Maria Rachid Viana
Coorientação: Profª. Dra. Maria Fani Dolabela
Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia, Belém, 2023.

1. Carapichea ipecacuanha . 2. Antimalárico. 3. Plasmodium falciparum . I. Título.

CDD 660.609811

CHRISTIAN NERI LAMEIRA

ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADE ANTIMALÁRICA DE *Carapichea ipecacuanha* (BROT.) L. ANDERSON – (*Rubiaceae*)

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia – Rede BIONORTE no Instituto Evandro Chagas, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Biodiversidade e Biotecnologia.

Orientadora: Dra. Giselle Maria Rachid Viana.
Coorientadora: Profa. Dra. Maria Fani Dolabela

Aprovada em 07/ 03/ 2023

Banca examinadora:

Documento assinado digitalmente
gov.br
GISELLE MARIA RACHID VIANA
Data: 27/12/2024 21:49:38-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof.ª Dra. Giselle Maria Rachid Viana - Presidente (IEC)

Documento assinado digitalmente
gov.br
SANDRO PERCARIO
Data: 08/01/2025 10:57:02-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof. Livre Docente Sandro Percário - Membro Titular Interno (UFPA)

Documento assinado digitalmente
gov.br
JOSE LUIZ FERNANDES VIEIRA
Data: 17/02/2025 14:52:10-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof. Dr. José Luiz Fernandes Vieira - Membro Titular Externo (UFPA)

Documento assinado digitalmente
gov.br
JOSE RICARDO DOS SANTOS VIEIRA
Data: 28/01/2025 17:09:18-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof. Dr. José Ricardo dos Santos Vieira - Membro Titular Externo (UFPA)

Documento assinado digitalmente
gov.br
LUANN WENDEL PEREIRA DE SENA
Data: 30/01/2025 06:49:08-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof. Dr. Luann Wendel Pereira de Sena - Membro Titular Externo (UNIFESSPA)

TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA PUBLICAÇÃO

Eu, Christian Neri Lameira, autorizo a publicação da versão final aprovada de minha Tese de Doutorado intitulada "ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADE ANTIMALÁRICA DE *Carapichea ipecacuanha* (BROT.) L. ANDERSON – (*Rubiaceae*)" no portal do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia – Rede BIONORTE (PPG-BIONORTE), bem como no repositório da CAPES ou junto à biblioteca da Instituição Certificadora.

Local/Data: Ananindeua, 24 de abril de 2024

gov.br
Documento assinado digitalmente
CHRISTIAN NERI LAMEIRA
Data: 26/12/2024 22:27:25-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

_____

Christian Neri Lameira

CPF: 581.031.042-72

RG: 2404802 SSP/PA

Dedicatória.

Aos meus avós Antônio e Benedita Nery e João e Nazaré Lameira (*in memorian*), ao meu irmão Jeancerico (*in memorian*) que de onde estiverem celebram mais uma conquista.

Ao meu pai, Osmar Lameira, fonte de inspiração, de sabedoria e de aconselhamento.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus Pai, que sem sua generosidade seria impossível a realização deste trabalho. A minha grande amiga e orientadora Dra. Giselle Rachid, por acreditar no projeto e pela paciência ao longo desta jornada, foram momentos difíceis e conturbados para todos nós. A Dra. Fani Dolabela, por toda sua expertise quanto ao desenvolvimento do projeto. Ao Zé Mário (IEC), de aluno a meu instrutor, sua contribuição foi imprescindível. A Milena Cristina da Silva, suas observações foram exitosas à análise da atividade antiplasmódica. A Nathália, Jéssica e Flávia, amigas do IEC, sempre dispostas a ajudar. Ao Michael, Rogério e Zema (IEC), que vieram contribuir e abrilhantar a finalização deste trabalho. Aos meus alunos da IC, Saint Clair e Afonso, que contribuíram para o início do desenvolvimentodo trabalho. Ao Dr. Osmar Lameira, meu pai, pesquisador dedicado às plantas medicinais e curador da ipeca.

Ao Instituto Evandro Chagas, por permitir usar suas instalações para desenvolvimento do projeto. A Embrapa Amazônia Oriental, que cedeu todo o material vegetal para análise. Ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia – Rede Bionorte. Ao Centro Universitário Fibra e a Universidade Federal do Pará, que dispuseram de seus laboratórios para que o projeto fosse iniciado.

A minha família amada e querida, mãe, irmãos, tios, primos e sobrinhos, amo vocês, desculpem a ausência.

Aos meus filhos Thiago Henry, Pérola Christine e Maria Eduarda, e ao meu enteado Pedro Arthur, espero que um dia vocês possam seguir o mesmo caminho que seu avô Osmar e eu trilhamos.

Em especial a minha esposa Rosi e a Fafá, duas pessoas extraordinárias, tenham paciência com os Lameiras, amo vocês.

Muitíssimo obrigado!

LAMEIRA, Christian Neri. **Estudo fitoquímico e atividade antimalárica de *Carapichea ipecacuanha* (Brot.) L. Anderson – (*Rubiaceae*).** 2023. 144 f. Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia) – Universidade Federal do Pará, Belém, 2023.

RESUMO

A malária é uma doença infecciosa causada por parasitos do gênero *Plasmodium*, ocorrendo, em 2021, 247 milhões de casos e com a morte de 619.000 pessoas. O parasito da adquiriu resistência a grande parte dos esquemas terapêuticos disponíveis. Logo, buscar a alternativas terapêuticas é urgente, sendo as plantas importantes fontes de fármacos antimaláricos. *Carapichea ipecacuanha* é utilizada na medicina tradicional para o tratamento da malária, estudos químicos levaram ao isolamento de alcaloides.O presente estudo avaliou se fatores inerentes ou não da planta interferiram na composição da espécie. Ainda, avaliou-se a possível atividade antiplasmodial de seus extratos. A quantificação dos alcaloides foi feita cromatografia líquida de alta eficiência. Na avaliação da atividade antimalárica *in vitro* utilizou-se o método do microteste, sendo considerado ativo a amostra com a concentração inibitória 50% (CI_{50}) < 10µg/mL. A determinação da viabilidade celular foi realizada a partir do plaqueamento de eritrócitos humanos em meio RPMI-1640. A técnica de micronúcleos com bloqueio da citocinese foi utilizada para determinar a genotoxicidade. O *docking* molecular foi utilizado para determinar os possíveis alvos terapêuticos dos alcaloides, como também determinar o local de ação junto ao parasito. Determinou-se que, as condições ambientais não alteraram a composição química qualitativa das amostras, que as concentrações dos alcaloides sofrem interferência dos fatores analisados, que os extratos da espécie apresentaram atividade antiplasmodial e que os alcaloides emetina e cefalina demonstram ter possivelmente atividade gametocida.

Palavras chaves: *Carapichea ipecacuanha*; Antimalárico; *Plasmodium falciparum*; Emetina.

LAMEIRA, Christian Neri. **Phytochemical study and antimalarial activy of *Carapichea ipecacuanha* (Brot.) L. Anderson – (*Rubiaceae*).** 2023. 144 f. Thesis (PhD in Biodiversityand Biotechnology) – Federal University of Pará, Belém, 2023.

ABSTRACT

Malaria is an infectious disease caused by parasites of the genus *Plasmodium*, occurring in 2021, 247 million cases and with the death of 619,000 people. The parasite has acquired resistance to most of the available therapeutic schemes. Therefore, seeking therapeutic alternatives is urgent, with plants being important sources of antimalarial drugs. *Carapichea ipecacuanha* is used in traditional medicine for the treatment of malaria, chemical studies have led to the isolation of alkaloids. The present study evaluated whether inherent factors of the plant interfered in the composition of the species. Furthermore, the possible antiplasmodial activity of its extracts was evaluated. The quantification of alkaloids was performed by high performance liquid chromatography. In the evaluation of in vitro antimalarial activity, the microtest assay was used, with a sample with an inhibitory concentration of 50% (IC50) < 10µg/mL being considered active. Cell viability was determined by plating human erythrocytes in RPMI-1640 medium. The cytokinesis-blocking micronucleus technique was used to determine genotoxicity. Molecular docking was used to determine the possible therapeutic targets of the alkaloids, as well as to determine the site of action on the parasite. It was determined that the environmental conditions did not alter the qualitative chemical composition of the samples, that the concentrations of alkaloids suffer interference from the analyzed factors, that the extracts of the species showed antiplasmodial activity and that the alkaloids emetine and cephaeline demonstrate possibly gametocidal activity.

Keywords: *Carapichea ipecacuanha*; Antimalarial; *Plasmodium falciparum*; Emetine.

LISTA DE FIGURAS, TABELAS E QUADROS

Figura 1 – Ciclo de vida do parasito da malária. **16**

Figura 2 – Principais alvos das drogas antimaláricas esquizonticidas em *Plasmodium* spp. **20**

Figura 3 – Degradação da hemoglobina e ação de compostos quinoleícos no vacúolo digestivo do *P. falciparum* pelaligação à hematina. **22**

Figura 4 – Esquema representativo da via metabólica afetada pela ação dos antifolatos Sulfadoxina-Pirimetamina. **23**

Figura 5 – Planta adulta de *C. ipecacuanha*. **27**

Figura 6 – Estrutura da dihidroemetina. **28**

CAPÍTULO I

Figura 1 – Planta adulta de *P. ipecacuanha*. **41**

Tabela 1 – Dados mensais de temperatura média (ºC) e precipitação pluviométrica (mm) obtidos em 2019 na estação agrometeorológica da Embrapa Amazônia Oriental. **43**

Tabela 2 – Prospecção fitoquímica da raiz da *Psychotria ipecacuanha*, do banco ativo de germoplasma (BAG) da Embrapa Amazônia Oriental. **45**

CAPÍTULO II

Figura 1 – Estrutura química dos fármacos antimaláricos da classe das quinolinas. **52**

Figura 2 – Estrutura química dos fármacos atovaquona, artemisinina e derivados. **53**

Figura 3 – Estrutura química da dihidroemetina. **58**

CAPÍTULO III

Figura 1 – Dados mensais de temperatura média (ºC) e precipitação pluviométrica (mm) obtidos na estação agrometeorológica da Embrapa Amazônia Oriental. **70**

Figura 2 – Padrão fenológico de *C. ipecacuanha* cultivadas no Horto de Plantas Medicinais da Embrapa Amazônia Oriental. **71**

Tabela 1 – Valores médios dos alcaloides cefalina e emetina determinados em cromatografia líquida de alta eficiência em amostras de *Carapichea ipecacuanha* obtidas em períodos de maior e menor precipitação pluviométrica. **72**

CAPÍTULO IV

Figura 1 – Fluxograma para mostrar os critérios de seleção utilizadas na revisão sistemática. **83**

Figura 2 – Percentual de publicações sobre a atividade antimalárica *in vitro* de drogas. **84**

Quadro 1 – Artigos elegíveis destacando o título, autores e ano de publicação, tipo de estudo e abordagem adotada pela pesquisa. **85**

Figura 3 – Métodos de cultivo utilizados nos artigos avaliados. **87**

Figura 4 – Métodos de análise de drogas utilizadas nos ensaios. **89**

CAPÍTULO V

Quadro 1 – Classificação das amostras analisadas, em consonância aos resultados da CI_{50} para atividade antiplasmódica. **109**

Quadro 2 – Cálculo do CBPI e do IR **111**

Tabela 1 – Concentração inibitória de 50% (CI_{50}) do crescimento dos clones W2 e Dd2 de *P. falciparum* do extrato bruto das raízes de *C. ipecacuanha* obtidos durante o inverno e verão Amazônico. **112**

Figura 1 – Dose versus resposta na atividade antiplasmódica dos extratos de *C. ipecacuanha* e da cloroquina frente as cepas W2 e Dd2 de *P. falciparum*. **113**

Figura 2 – Número de células mononucleadas e multinucleadas para cálculo da CBPI. **114**

Figura 3 – Quantidade de células multinucleadas e seus respectivos CBPI. **115**

Quadro 3 – Índice da CBPI, da citostase e da RI. **116**

CAPÍTULO VI

Figure 1 – Chemical structures of emetine (left) and cephaeline (right). **125**

Figure 2 – Bioavailability radar of emetine (left) and cephaeline (right). **125**

Figure 3 – Comparative gastrointestinal absorption and brain penetration of emetine and cephaeline. **126**

Figure 4 – Target classes of emetine (up) and cephaeline (down). **127**

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 12
1.1 OBJETIVO GERAL 13
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 13
2. REFERENCIAL TEÓRICO 14
2.1 MALÁRIA, UM BREVE HISTÓRICO 14
2.2 CICLO BIOLÓGICO EM HUMANOS 15
2.3 DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO 16
2.4 DESCOBERTA DE DROGAS ANTIMALÁRICAS 20
2.5 MECANISMO DE AÇÃO DAS PRINCIPAIS DROGAS ANTIMALÁRICAS 21
2.5.1 Quinino 21
2.5.2 Cloroquina 21
2.5.3 Mefloquina 23
2.5.4 Antifolatos 23
2.5.5 Primaquina 24
2.5.6 Artemisinina e seus derivados 24
2.5.7 Tafenoquina 25
2.5.8 Lumefantrina 25
2.5.9 Novas drogas 26
2.6 PESQUISA DE PRODUTOS NATURAIS E USO ETNOBOTÂNICO 27
2.7 DESCRIÇÃO BOTÂNICA DA IPECA 27
2.8 FITOQUÍMICA, USO E PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS DA *C. ipecacuanha* 28
29
2.9 INTERFERÊNCIA DO AMBIENTE NA COLETA DE AMOSTRAS VEGETAIS
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 31
CAPÍTULO I 40
INFLUÊNCIA CLIMÁTICA NA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA IPECA (*Psychotria ipecacuanha* BROT. STOKES) CULTIVADA EM BELÉM/PA 40
INTRODUÇÃO 40

METODOLOGIA 43
DADOS CLIMÁTICOS 43
OBTENÇÃO DOS EXTRATOS 44
PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA 44
RESULTADOS E DISCUSSÃO 45
CONCLUSÃO 46
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 46
CAPÍTULO II 49
CONTRIBUIÇÕES DAS PLANTAS MEDICINAIS PARA O TRATAMENTO DA MALÁRIA: UM REFERENCIAL TEÓRICO 49
INTRODUÇÃO: MALÁRIA, UM BREVE HISTÓRICO 50
DESENVOLVIMENTO 51
DESCOBERTA DOS PRINCIPAIS ANTIMALÁRICOS E CONTRIBUIÇÕES DAS PLANTAS MEDICINAIS PARA O TRATAMENTO DA MALÁRIA 51
RESISTÊNCIA DOS PLASMÓDIOS AOS ANTIMALÁRICOS E A NECESSIDADE DE BUSCAR NOVOS FÁRMACOS 54
AS PLANTAS MEDICINAIS AMAZÔNICAS E ALGUNS ESTUDOS PARA ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIMALÁRICA 57
CONSIDERAÇÕES FINAIS 59
REFERÊNCIAS 60
CAPÍTULO III 65
INFLUÊNCIA DA PLUVIOSIDADE E DA FENOLOGIA NO PERFIL CROMATOGRÁFICO DE *Carapichea ipecacuanha* (BROT.) L. ANDERSSON (*Rubiaceae*) 65
INTRODUÇÃO 67
PARTE EXPERIMENTAL 69
Material botânico 69
Extração de alcaloides 69
Solução padrão de emetina e cefalina 69
Separação, identificação e quantificação dos alcaloides 70
Dados climáticos 70
Padrão fenológico 71
RESULTADOS E DISCUSSÃO 71
CONCLUSÕES 73
AGRADECIMENTOS 74

REFERÊNCIAS 74
CAPÍTULO IV 76
MÉTODOS *in vitro* PARA ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIMALÁRICA: REVISÃO INTEGRATIVA E ANÁLISE 76
INTRODUÇÃO 79
METODOLOGIA 80
RESULTADO E DISCUSSÃO 82
CONSIDERAÇÕES FINAIS 95
REFERÊNCIAS 96
CAPÍTULO V 105
ATIVIDADE ANTIPLASMÓDICA E CITOTOXICIDADE DE *Carapichea ipecacuanha* (BROT.) L. ANDERSON 105
INTRODUÇÃO 106
METODOLOGIA 107
Aspectos ético e biossegurança 107
Material botânico 107
Obtenção dos extratos 107
Clones de referência 108
Atividade antimalárica *in vitro* 108
Cálculo do índice de proliferação celular por bloqueio de citocinese (CBPI) 109
Ensaio *in vitro* de bloqueio de citocinese do micronúcleo (BCMN) com células sanguíneas humanas totais 111
Análise estatística 112
RESULTADO E DISCUSSÃO 112
Atividade antiplasmódica 112
Cálculo do índice de proliferação celular por bloqueio de citocinese (CBPI) 114
Teste de genotoxicidade 116
CONCLUSÃO 117
REFERÊNCIAS 118
CAPÍTULO VI 122
PREDICTION OF PHAMACOLOGICAL PROPERTIES OF EMETINE AND CEPHAELINE 122
Introduction 123
Material and Methods 124
Results 124

Discussion 127
Conclusions 129
References 129
APÊNDICES 134
APÊNDICE 1 – POP PROCEDIMENTO PARA CULTIVO CONTÍNUO DAS CEPAS DE *Plasmodium falciparum* 135
ANEXOS 141
ANEXO 1 – Capítulo 1 publicado no livro "Avanços nos Estudos da Biodiversidade e Biotecnologia na Amazônia". 142
ANEXO 2 – Capítulo 2 publicado no livro "Pesquisa em Saúde & Ambiente na Amazônia: perspectivas para sustentabilidade humana e ambiental na região". 143
ANEXO 3 – Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética e Pesquisa do Instituto Evandro Chagas. 144

1 INTRODUÇÃO

A malária é uma doença infecciosa causada por um parasito unicelular do gênero *Plasmodium* (BRASIL, 2020), sua transmissão ocorre de forma vetorial através da fêmea do culicídeo do gênero *Anopheles* (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019).

Dados publicados no *World Malaria Report* 2022 da *World Health Organization* – WHO, em 2021 aproximadamente 4 bilhões de pessoas estiveram suscetíveis à doença, com registro de 247 milhões de infectados e que ocasionaram à morte de 619.000 indivíduos. Nas américas mais de 78% dos casos estão concentrados na Venezuela, Brasil e Colômbia. No Brasil, em 2021, ocorreram 162.016 notificações, com 58 óbitos registrados, e apesar de ocorrer surtos em outras regiões do país, a malária está praticamente restrita a bacia amazônica,99% dos casos (WHO, 2022).

A transmissão do *Plasmodium* ocorre durante o repasto sanguíneo, quando o mosquito infectado inocula junto com a saliva esporozoítos no hospedeiro humano. Os esporozoítos infectam os hepatócitos e se transformam em esquizontes, dando início ao ciclo assexuado (MÉNARD *et al*., 2013), quando a fêmea do anofelino suga o sangue do indivíduo com razoável número gametócitos, estes irão sofrer transformação no estômago do mosquito, onde ocorrerá a fecundação dos gametas, originando o zigoto que se transforma em oocineto dando início ao ciclo sexuado da doença (BRASIL, 2020).

O Ministério da Saúde (MS) por meio da Política Nacional de Tratamento da Malária (PNTM) visa orientar a terapêutica e disponibilizar os medicamentos antimaláricos utilizados em todo território nacional por meio do Sistema Único de Saúde – SUS (BRASIL, 2020) e através do Guia Prático de Tratamento da Malária visa facilitar o diagnóstico e tratamento da doença (BRASIL, 2020).

A escolha do antimalárico deve considerar a espécie do plasmódio suspeito ou confirmado, idade do paciente, gravidade do quadro clínico, padrão de resistência na área onde a infecção foi adquirida, quimioprofilaxia e tratamento anterior, história de exposição anterior e condições associadas tais como gravidez e outros problemas de saúde (WHO, 2021).

A presença de parasitas no sangue é confirmatória para patologia e o diagnóstico microscópico continua sendo o padrão para detecção, pois apresenta custo relativamente baixo, alta especificidade e sensibilidade (GLÓRIA *et al*., 2018).

No século XVII missionários Jesuítas descobriram que tribos indígenas sul-americanas utilizavam a casca de uma árvore, para o tratamento de febres. O princípio ativo desta árvore, a quinina, manteve-se como fármaco de eleição para tratamento e prevenção da malária por muito tempo (OLIVEIRA e SZCZERBOWSKI, 2009). A década de 60 é relatada como marco

inicial à resistência aos fármacos antimaláricos, pois neste período que houve consenso sobre a resistência à cloroquina (MANZALI DE SÁ, 2011).

A já conhecida resistência do *Plasmodium* aos derivados do quinina e a recente resistência a artemisinina associada a outras drogas observadas em países da Ásia como Mianmar, Camboja, Vietnã, Tailândia, Laos e na província de Yunnan, na China (WHO, 2016), justificam a busca por novas substâncias que possam ser utilizados como opção terapêutica.

Classicamente os alcaloides são relacionados à atividade antimalárica e a investigação fitoquímica da Família *Rubiaceae* revela que os alcaloides indólicos são seus marcadores químicos (CARBONEZI *et al*., 2004) e os encontrados nas espécies desta Família demonstram diversos efeitos farmacológicos, entre eles o antimalárico (FORMAGIO *et al*., 2014).

Nas raízes da *Carapichea ipecacuanha* (*Rubiaceae*) são encontradas várias substâncias, como por exemplo, os alcaloides emetina e cefalina, estando relacionados às propriedades terapêuticas da planta (BOTERO *et al*., 2015).

Conforme relatado, a emetina é um dos alcaloides presentes na *C. ipecacuanha*, e apesar do uso da espécie na medicina tradicional no tratamento da malária e da atividade antimalárica do cloridrato de emetina, o sal do alcaloide majoritário, até o presente, nenhum estudo avaliou a atividade antimalárica do seu extrato, frações e de outros metabólitos presentes na espécie.

1.1 OBJETIVO GERAL

Realizar estudo fitoquímico e determinar a atividade antimalárica *in vitro* do extrato etanólico das raízes de *Carapichea ipecacuanha* (Brot.) L. Andersson.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar se os aspectos fenológicos da espécie, o índice pluviométrico e a temperatura média da área de cultivo da *C. ipecacuanha* interferem no teor de seus componentes químicos (qualitativos e quantitativos); avaliar o efeito antiplasmódico *in vitro* dos extratos hidroalcóolicos das raízes de *C. ipecacuanha*; verificar se condição ambiental influencia na atividade antimalárica da espécie; determinar o potencial citotóxico e genotóxicos dos extratos analisados; avaliar do docking molecular os possíveis alvos dos alcaloides emetina e cefalina.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 MALÁRIA, UM BREVE HISTÓRICO

A malária é uma doença infecciosa causada por um parasito unicelular do gênero *Plasmodium* (BRASIL, 2020), sua transmissão ocorre de forma vetorial através da fêmea do culicídeo do gênero *Anopheles* (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019). Hipócrates foi o primeiro a detalhar as febres intermitentes da malária e associar a doença com o meio ambiente em especial os corpos d'água. Os romanos faziam a mesma associação e acreditavam que a contaminação das pessoas ocorria quando se respirava o ar dos pântanos, assim o termo malária surgiu do latim "*mal* – mau' e '*aria* – ar". Posteriormente os franceses associaram a malária ao termo "paludismo" – pântano (FRANÇA *et al*., 2008).

Desde a antiguidade este agravo acompanha o homem, há registros chineses de prováveis infecções datadas de 2700 a.C. (BRUCE-CHWATT, 1989). O surgimento da malária nas Américas está associado ao processo de colonização dos europeus, trazendo consigo *Plasmodium vivax* e *Plasmodium malariae*, o *Plasmodium falciparum* surgiu juntamente com a importação de escravos da África para o continente americano a partir do século XVII (LEITE *et al*., 2013). Entretanto, hipótese sugere que a propagação das populações de *Plasmodium* sp ocorreram a partir da atividade migratória das populações de *Homo sapiens* que migraram da África para Ásia acerca de 60 mil anos atrás, associado ao surgimento da atividade agrícola, até a chegada ao continente americano (TANABE *et al*., 2013).

A *World Health Organization* (WHO) estimou que em 2020 quase 4 bilhões de pessoas estivessem suscetíveis à malária, com registro de 241 milhões de casos e que ocasionaram à morte de 627.000 pessoas, incremento de 12% em relação a 2019. A maioria dos casos e mortes registradas ocorreu na África subsaariana. Entretanto, foram registrados casos na América Latina, Mediterrâneo Oriental, Pacífico Ocidental e Sudeste Asiático (WHO, 2021). No Brasil, em 2020 houve 145.205 notificações, 7,8% a menos que no ano anterior. 99% dos casos estão concentrados na região da Amazônia Legal (BRASIL, 2021). No Brasil os casos de infecção estão associados ao *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae*, jamais foi descrito infecção autóctone por *P. ovale* (BRASIL, 2019). Entretanto a ocorrência de infecção por *Plasmodium simium* foi observada no Estado do Rio de Janeiro, o que torna imprescindível o controle da doença, pois a espécie tem como reservatório os macacos (BRASIL *et al*., 2017).

No primeiro semestre de 2020, foram diagnosticados 9 casos de malária na Bahia, todos importados, entretanto como há uma ampla dispersão de espécies do gênero *Anopheles*, torna os municípios vulneráveis à introdução ou reintrodução da doença (BAHIA, 2020), e apesar de ocorrer surtos em outras regiões do país, a malária está praticamente restrita a bacia amazônica

com 99,8% dos casos, certamente associado as condições propicias para transmissão da doença (SOUZA, 2019)

2.2 CICLO BIOLÓGICO EM HUMANOS

Os plasmódios se reproduzem por dois processos distintos: o assexuado, denominado de esquizogonia, que ocorre no hospedeiro vertebrado ou intermediário e outro sexuado, chamado de esporogonia, que ocorre no hospedeiro invertebrado ou definitivo, o mosquito (SOUSA & FERREIRA, 2002).

A transmissão do *Plasmodium* ocorre durante o repasto sanguíneo, quando o mosquito infectado inocula junto com a saliva esporozoítos no hospedeiro humano. Os esporozoítos infectam os hepatócitos e se transformam em esquizontes. Esses se replicam e transformam-se em merozoítos que são liberados na corrente sanguínea onde invadem as células vermelhas transformando-se em trofozoítos, período pré-patente.

Logo os trofozoítos se transformam em merozoítos que são liberados na corrente sanguínea e continuam invadindo células vermelhas, repetindo o ciclo assexuado (MÉNARD *et al*., 2013), uns são fagocitados pelas células de Kupffer e outros irão parasitar os eritrócitos, sofrendo vários estágios de maturação e transformando-se em trofozoítos, que se multiplicam pelo processo da esquizogonia, resultando em verdadeiros conglomerados de merozoítos nos eritrócitos, os esquizontes sanguíneos. Então, os eritrócitos abarrotados de parasitos se rompem liberando-os. Neste momento, o indivíduo infectado começa a apresentar os sintomas da doença.

Alguns destes merozoítos deixam de se multiplicar e sofram alterações morfológicas e funcionais, passando a constituir os gametócitos (masculino e feminino). Quando a fêmea do anofelino suga o sangue do indivíduo com plasmódios circulantes, com razoável número gametócitos, que passaram por transformação no estômago do mosquito, onde ocorrerá a fecundação dos gametas, originando o zigoto, que se transforma em oocineto. Este penetra na parede do estômago e cai na hemolinfa do mosquito, transformando-se em oocisto, o qual da origem a esporozoítos, que irão se alojar nas glândulas salivares do mosquito, quando, então, as fêmeas tornam-se infectantes, estando, portanto, aptas a transmitirem a doença ao sugar o sangue de um novo indivíduo, fechando assim, o ciclo evolutivo dos plasmódios (BRASIL, 2020).

Na espécie *P. vivax* alguns parasitas podem-se tornar dormentes no fígado, chamados de hipnozoítos, e só mais tarde serem liberados dando origem às recaídas (BRASIL, 2020). O ciclo biológico da malária está representado na Figura 1.

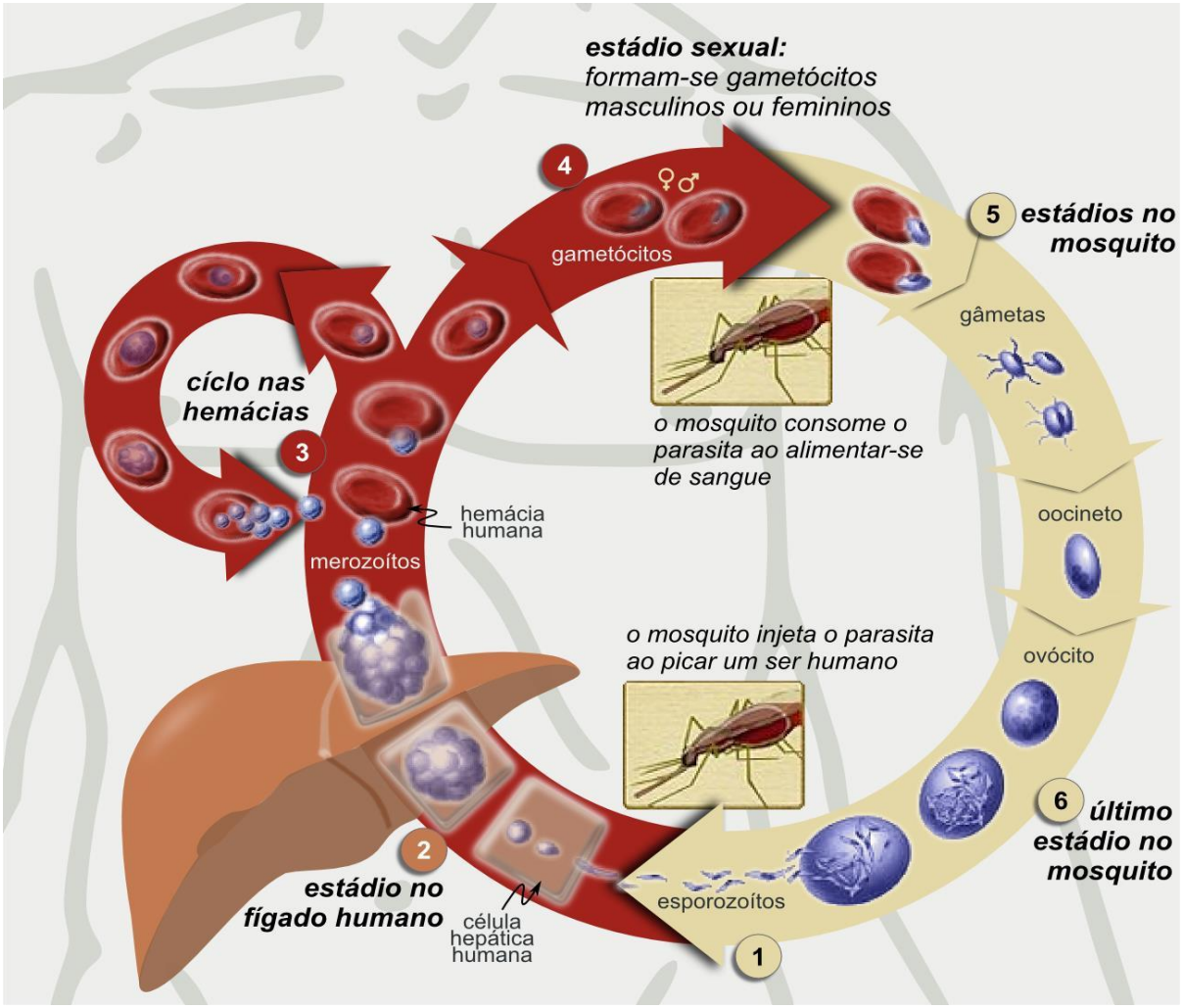


Fig. 1: Ciclo de vida do parasito da malária (fonte: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/e/e4/Life_Cycle_of_the_Malaria_Parasite-pt.png)

2.3 DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO

Em 2022, o Governo Brasileiro lançou o Plano Nacional de Eliminação da Malária, que busca definir estratégias para eliminação da malária no Brasil até 2035, ou seja, o país sem malária autóctone. Para alcançar este objetivo, planeja-se reduzir os casos para menos de 68 mil em 2025, já em 2030 espera-se ter menos de 14 mil casos, zero óbitos, além de se ter eliminado a transmissão por *P. falciparum*. A partir de 2030, manter a taxa zerada de óbitos e livre de malária por *P. falciparum* e em 2035 eliminar a transmissão de malária (BRASIL, 2022).

O Ministério da Saúde (MS) por meio do Programa Nacional de Prevenção e Controle da Malária (PNCM) objetiva reduzir a letalidade e a gravidade dos casos, reduzir a incidência da doença, eliminar a transmissão em áreas urbanas e manter a ausência da doença em locais onde a transmissão já foi interrompida, pela Política Nacional de Tratamento da Malária visa orientar a terapêutica e disponibilizar os medicamentos antimaláricos utilizados em todo território nacional por meio do Sistema Único de Saúde (SUS). Para cumprir essa política, o

PNCM preocupa-se em revisar o conhecimento vigente sobre o arsenal terapêutico da malária e sua aplicabilidade para o tratamento dos indivíduos que dela padecem em nosso país (BRASIL, 2020).

Para facilitar o diagnóstico e tratamento da malária, o Ministério da Saúde disponibiliza o Guia Prático de Tratamento da Malária no Brasil que apresenta todas as orientações relevantes sobre a indicação e uso de antimaláricos preconizados, de acordo com cada grupo etário. O diagnóstico da malária em pacientes oriundos de áreas endêmicas deve ser pensado emsituações em que o paciente apresente febre de qualquer intensidade, duradoura e frequente; apresente mal-estar, dor no corpo e nas articulações, fadiga e falta de apetite; síndrome febril hemorrágica, ictérica, neurológica, respiratória ou com forte dor abdominal (BRASIL, 2021).

O objetivo do tratamento da doença é atingir o parasito em pontos chave do seu ciclo biológico como: na interrupção da esquizogonia sanguínea, destruição das formas latentes teciduais e na interrupção da sua transmissão (BRASIL, 2020).

A escolha do antimalárico deve considerar a espécie do plasmódio suspeito ou confirmado, idade do paciente, gravidade do quadro clínico, padrão de resistência na área onde a infecção foi adquirida, quimioprofilaxia e tratamento anterior, história de exposição anterior e condições associadas tais como gravidez e outros problemas de saúde (WHO, 2006; CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2018).

A prescrição e dispensação do medicamento só deve ser realizada a partir da confirmação do resultado laboratorial confirmatório, sendo recomendável que a dosagem do medicamento seja ajustada de acordo com o peso do paciente, para que se garanta eficácia e reduzida toxicidade no tratamento (BRASIL, 2020).

A presença de parasitas no sangue é confirmatória para patologia e o diagnóstico microscópico continua sendo o padrão para detecção, pois apresenta custo relativamente baixo, alta especificidade e sensibilidade (GLÓRIA *et al*., 2018). O exame é feito pela técnica da gota espessa, onde a amostra de sangue do paciente é espalhada como um esfregaço (espesso ou fino), posteriormente corada com a coloração Giemsa ou Romanovsky e examinada com uma objetiva de imersão em óleo 100X, onde detecta-se a presença dos parasitos da malária (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2020). A técnica permite, com microscopista experiente, a diferenciação das espécies, bem como seu estágio de evolução. Ainda é possível detectar densidades baixas de parasitos (5-10 parasitos/μL de sangue) e determinar a parasitemia (BRASIL, 2020).

Os testes de diagnósticos rápidos (TDR) fundamentam-se na detecção de anticorpos monoe policlonais, revelados por método imunocromatográfico e estão disponíveis em kits que permitem diagnóstico entre 15 a 20 minutos. Para *P. falciparum* a sensibilidade é superior

a 90%, quando comparado ao diagnóstico microscópico com densidade maior que 100 parasitos/µL na amostra. Entretanto, o método não permite avaliar o nível de parasitemia, além da possível perda de qualidade, em condições de campo, quando armazenados por longos períodos. Conforme recomenda o PNCM, o uso dos TDR, deve ser priorizado nos locais ondeo acesso ao diagnóstico microscópico é dificultoso e para ampliação da capacidade diagnóstica. Independente da condição, a utilização do TDR deve ser informada na ficha de notificação/investigação (BRASIL, 2020).

O diagnóstico por técnicas moleculares é utilizado em unidades de referência ou como forma de realizar controle de qualidade do diagnóstico laboratorial (TORRES *et al*., 2006). A técnica não deve ser aplicada em casos de suspeita da malária. Seu resultado está relacionado a exposição prévia, e no contexto clínico à demora no diagnóstico expõe o paciente ao risco de complicações (BRASIL, 2020).

A malária não complicada é ocasionada por *P. vivax* e *P. ovale,* o objetivo do tratamento é a cura radical, ou seja, curar tanto a forma sanguínea quanto a hepática e, dessa forma, prevenir a recrudescência e recaída, respectivamente (BRASIL, 2020). As drogas antimaláricas de primeira escolha para pacientes com idade e pesos superiores a 1 ano e 10Kg, respectivamente, são cloroquina 150mg, associados a primaquina de 5mg ou 15mg, de acordo com o grupo etário e o peso do paciente, pois somente as 8-aminoquiloninas possuem atividade contra os hipnozoítos (COMMONS *et al*., 2018).

Em crianças menores de 6 meses ou com peso inferior a 5Kg é preconizado o uso de artemeter 20mg associado a lumefantrina 120mg. Para pacientes com idade entre 6-11 meses e peso entre 5-9Kg utiliza-se a combinação de artemeter 20mg + lumefantrina 120mg, intercalada com a primaquina 5mg (BRASIL, 2020). Pacientes com peso idade superior a 15 anos e peso entre 50-120Kg a dose de primaquina será ajustada pelo seu peso, variando entre 30-60mg de primaquina (DUARTE *et al*., 2001). Gestantes e puérperas até um mês de lactação não podem usar a primaquina e nem tafenoquina (GILDER *et al*., 2018), é preconizado a utilizaçãode cloroquina por três dias e cloroquina profilática (5 mg/kg/dose, até o máximo de dois comprimidos) semanalmente até um mês de aleitamento, para prevenção de recaídas (BRASIL, 2020). Para infecções ocasionadas por *P. vivax* e *P. ovale* poderá ser utilizado o artesunato 25mg associado a mefloquina 50mg.

Após o início do tratamento, entre os dias 5 e 60, caso o paciente volte apresentar malária por *P. vivax,* poderá ter ocorrido falha no tratamento. Neste sentido é necessário realizar novo esquema de tratamento mais eficaz, no caso, utilizar artemeter/lumefantrina ou artesunato/mefloquina durante três dias, além de 0,5mg/Kg/dia de primaquina durante 14 dias (BRASIL, 2020).

Estima-se que 5% das pessoas que vivem na Amazônia Brasileira apresentam deficiência da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase – G6PD (MONTEIRO *et al*., 2014), defeito genético capaz de provocar anemia hemolítica pela diminuição da habilidade das hemácias em lidar com o stress oxidativo (BEUTLER, 2008). No Brasil, há relato de óbito pelo uso de primaquina em paciente com deficiência grave da G6PD (LACERDA *et al*., 2012) e a utilização de tafenoquina aumenta a possibilidade de risco (BRASIL, 2020).

O uso das drogas em pessoas com deficiência enzimática pode resultar em manifestações clínicas como anemia grave por hemólise, fadiga e icterícia, sendo necessário a transfusão sanguínea, ainda ocasionar a insuficiência renal aguda (IRA), com necessidade de diálise (BRITO-SOUSA *et al*., 2019).

O tratamento de infecções ocasionadas por *P. malariae* assemelha-se ao utilizado para *P. vivax*, entretanto sem a necessidade de uso da primaquina (BRASIL, 2020). A WHO recomenda que o tratamento para malária ocasionada por *P. falciparum* deve ser combinada a um derivado da artemisinina, como por exemplo o artemeter/lumefantrina e o artesunato/mefloquina. A segurança destas drogas é bastante semelhante. Entretanto, a combinação artesunato/mefloquina, possui vantagem de ser administrada uma única vez ao dia, permitir profilaxia pós-tratamento (PEIXOTO *et al*., 2016) e de possuir apresentação pediátrica. A mefloquina em doses fracionadas apresenta menor risco de reação adversa e, quando ocorrem, o fracionamento o torna mais branda em comparação ao tratamento em que se utiliza dose única (FREY *et al*, 2010).

O uso de *Artemisinin Combined Therapy* (ACT) em crianças com idade inferior a 6 meses de idade e em mulheres no primeiro trimestre da gravidez, trata-se da melhor opção quando comparados ao tratamento realizado com quinina, pois apresenta diminuição da morbimortalidade dos pacientes (MCGREADY *et al*., 2012).

Em infecções mistas ocasionadas por *P. falciparum* e *P. vivax* (ou *P. ovale*), deve-se incluir o uso de drogas esquizonticidas sanguíneas eficazes, como o artemeter/lumefantrina ou artesunato/mefloquina, associadas à primaquina durante uma semana (BRASIL, 2020).

Estudos sugerem que a atovaquona/proguanil é mais efetiva que a mefloquina no tratamento da malária não complicada (OSEI-AKOTO *et al*., 2005). Os principais alvos de ação dos antimaláricos estão representados na Figura 2.

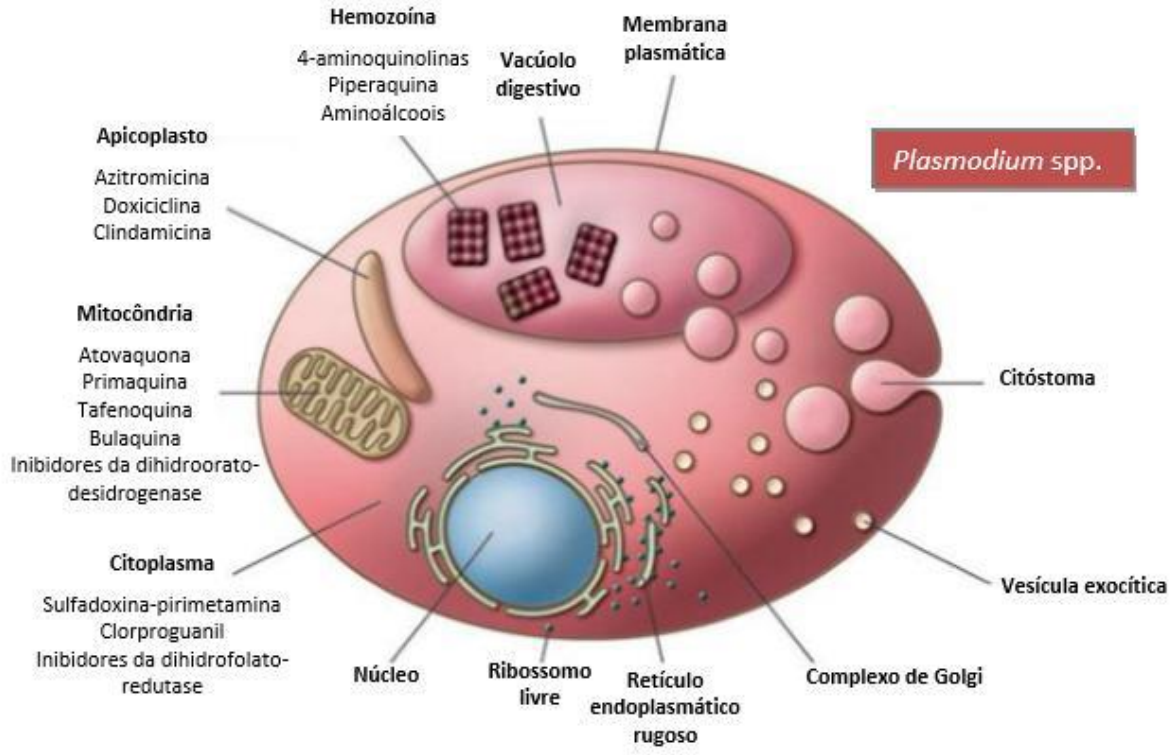


Figura 2. Representação dos alvos principais das drogas antimaláricas esquizonticidas em *Plasmodium* spp (Fonte: AZEVEDO, 2018).

2.4 A DESCOBERTA DE DROGAS ANTIMALÁRICAS

No século XVII missionários Jesuítas descobriram que tribos indígenas sul-americanas utilizavam a casca de uma árvore, para o tratamento de febres. O princípio ativo desta árvore, o quinina, foi isolado em 1820 por Pelletier e Caventou, e manteve-se como fármaco de eleição para tratamento e prevenção da malária por muito tempo (OLIVEIRA e SZCZERBOWSKI, 2009). A técnica para o desenvolvimento de moléculas sintéticas baseadas na estrutura do quinina 2 teve início no século XIX. Em 1850, o químico August W. von Hofmann, sugeriu a possibilidade de um derivado do carvão de alcatrão ser convertido em quinina. Posteriormente, verificou-se que ele era rico em isoquinolina e quinolina. Essas moléculas têm estruturas básicas a partir das quais outras moléculas podem ser formadas, por meio de sucessivas reações químicas (ALLINGER *et al*., 2017).

O sucesso terapêutico da cloroquina, primaquina e da pirimetamina e do diclorodifeniltriclorietano (DDT) no combate ao vetor no início da década de 1950, resultariam no Programa Global de Erradicação da Malária, aprovado pela OMS em 1957 (ROSENTHAL, 2001). A década de 60 é relatada como marco inicial à resistência aos fármacos antimaláricos, pois neste período que houve consenso sobre a resistência à cloroquina, o que estimulou novos programas de pesquisa e desenvolvimento (P&D) para a síntese de novos fármacos (MANZALI DE SÁ, 2011). Entre as décadas de 70 e 80 prosseguiam as pesquisas de novas drogas

antimaláricas, com o desenvolvimento de medicamentos como o fansidar, a mefloquina e a atovaquona/proguanil. No entanto, todos eles geraram a resistência do protozoário. O isolamento de derivados da artemisinina, a partir da *Artemisia annua*, mudou o foco da pesquisa e do desenvolvimento de antimaláricos, isto é, da síntese de substâncias de base quinolínicas para moléculas baseadas na estrutura da artemisinina (QIGUI *et al*., 2007).

Classicamente os alcaloides são relacionados à atividade antimalárica, a investigação fitoquímica da Família *Rubiaceae* revelam que os alcaloides indólicos são seus marcadores químicos (CARBONEZI *et al*., 2004), com destaque aos isoquinolínicos e quinolínicos (CORDELL *et al*., 2001) e diversas espécies são descritas com potencial antimalárico como a *Chinchona ledgeriana* (CORDELL *et al*., 2001), *Keetia leucantha* (BERO *et al*., 2009) e *Morinda moridoides* (ZIRIHI *et al*., 2005). Os alcaloides encontrados nas espécies desta Família demonstram efeitos farmacológicos como antiagregante plaquetário, citotóxico, analgésico, antimalárico e anti-leishmania (FORMAGIO *et al*., 2014).

2.5 MECANISMO DE AÇÃO DAS PRINCIPAIS DROGAS ANTIMALÁRICAS

2.5.1 Quinino

O Quinino (QN) é o alcaloide mais importante da casca da *Cinchona* spp (*Rubiaceae*), também chamada de quina e os primeiros registros oficiais da utilização deste princípio para tratamento de quadros febris datam de 1638. Porém, a propriedade antimalárica da quina só foi descoberta no século XIX (1820) e, durante muito tempo, o QN foi o único antimalárico disponível para tratamento de malária. Este fármaco é uma base fraca do grupo dos aminos álcoois (quinolinometanois) que induz a um desequilíbrio no vacúolo parasitóforo ou digestivo de pH ácido do *Plasmodium sp.* (semelhante ao que provoca a Cloroquina) inibindo, assim, a formação da hemozoína ou pigmento malárico e destruindo o parasito. No entanto, esta droga possui alta toxicidade e necessita ser administrada várias vezes ao dia devido ao seu curto tempo de meia-vida (SCHLESINGER, 1988; CAMARGO *et al*., 2009).

2.5.2 Cloroquina

A Cloroquina (CQ) foi descoberta e sintetizada na Alemanha em 1934 e, um ano depois, já utilizada em pacientes com malária por *P. vivax* durante a Segunda Guerra Mundial em consequência da ausência do Quinino. Esta droga rapidamente ganhou popularidade por ter alta eficácia, segurança devido sua baixa toxicidade, tolerância e ser uma droga barata para tratamento da malária por *Plasmodium sp.* (BAIRD, 2004; CAMARGO *et al*., 2009). Esta droga é do grupo das 4-aminoquinolinas, que tem como representantes a Amodiaquina e a Cloroquina,

e tem ação esquizonticida sanguínea para as espécies de *Plasmodium* humanas e no caso do *P. falciparum*, somente para cepas ainda sensíveis a este antimalárico (RIDLEY, 1998).

A inibição da formação hemozoína ocasiona a morte do parasito que é dependente da ligação do fármaco ao heme, através das formas mono e diméricas. A formação do complexo ocasiona estresse oxidativo, que pode ocasionar, peroxidação lipídica, danos ao DNA e oxidação de proteínas e com subsequente morte do parasito (EGAN e NCOKASI, 2005). O grupamento heme (II ferroprotoporfirina IX) formado, que é altamente tóxico, é liberado como produto desta atividade. Este grupamento é imediatamente oxidado em hematina (III ferroprotoporfirina IX), dando origem à hemozoína ou pigmento malárico por meio de uma reação de polimerização (SULLIVAN *et al*., 1996; RIDLEY, 1998).

Dessa maneira, a CQ atuaria sobre os plasmódios ligando-se à hematina, evitando sua polimerização e mantendo a atividade tóxica do metabólito formado. Assim, desestrutura membranas e proteínas celulares o que resulta na morte do parasito, ou seja, a ação antimalárica da CQ está relacionada a inibição da formação da hemozoína por consequência dos efeitos ocasionados pela desestabilização das membranas das organelas causada pela ferriprotoporfirina IX - FePPIX (COMBRINCK *et al*., 2012), como demonstrado na Figura 3.

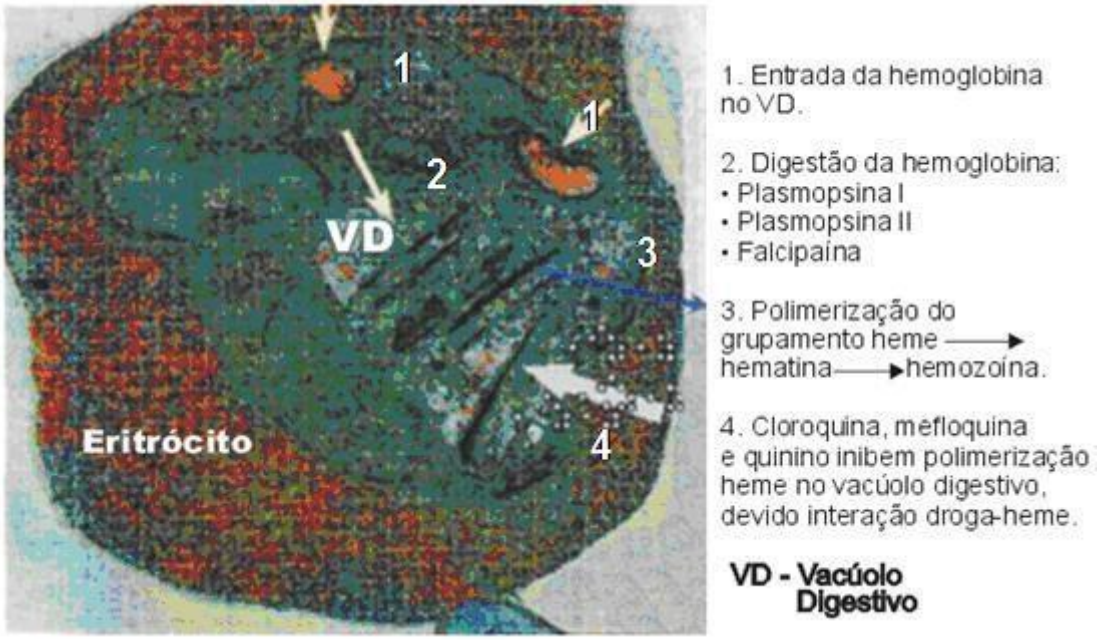


Fig. 3: Degradação da hemoglobina e ação de compostos quinoleícos no vacúolo digestivo do *P. falciparum* pela ligação à hematina, impedindo sua polimerização e destruindo o parasito. Adaptado de Zalis, 2000.

2.5.3 Mefloquina

A Mefloquina (MQ), assim como o QN, também pertence ao grupo dos quinolinometanois e foi sintetizada na década de 60, como uma droga promissora frente ao aparecimento de cepas de *P. falciparum* resistentes à CQ. Porém, esta estratégia foi deficiente em razão de agir como esquizonticida sanguíneo prolongado, uma vez que a MQ tem uma eliminação lenta do organismo, o que pode facilitar a seleção de parasitos em concentrações sub-terapêuticas. A principal hipótese relacionada ao mecanismo de ação deste agente é que também esteja ligado à inibição da formação do pigmento malárico ou hemozoína, resultando no acúmulo da heme livre, que é tóxico para o parasita (SULLIVAN, 1998; CAMARGO *et al.*, 2009).

2.5.4 Antifolatos

Os antifolatos são drogas de ação contra todas as fases de desenvolvimento do parasito e que foram muito utilizados para prevenção e tratamento de infecções por *P. falciparum* (Figura 4). Entre seus representantes mais conhecidos, há o grupo das sulfonamidas (Sulfadiazina e Sulfadoxina) e as diaminopirimidinas (Pirimetamina e Proguanil), onde a combinação da Sulfadoxina com a Pirimetamina (SP) é conhecida comercialmente como Fansidar®.

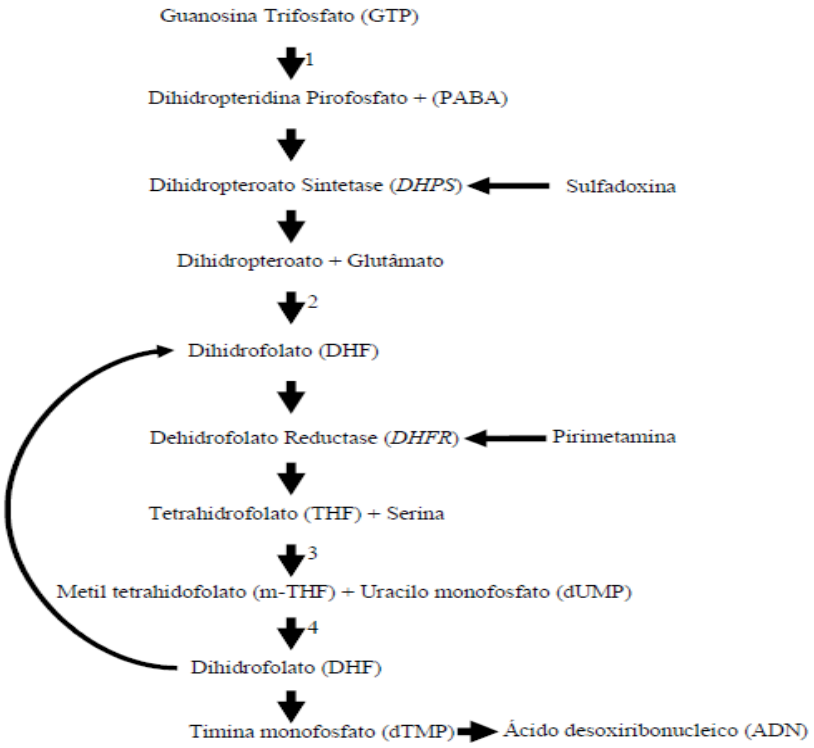


Figura 4: Esquema representativo da via metabólica afetada pela ação dos antifolatos Sulfadoxina-Pirimetamina (1, 2, 3, 4): Enzimas envolvidas no processo metabólico: 1. Hidroximetil dihropteridina aldolase; 2. dihidrofolato sintetase; 3. SHMT: serina hidroximetiltransferase; 4. TS: timidilato sintetase (Fonte: Adaptado de CAMARGO *et al*., 2009).

As drogas possuem mecanismos de ação distintos, as sulfonamidas afetam o metabolismo do folato pela competição com a enzima diidropteroato sintetase, ou seja, são antagonistas metabólicos competitivos do ácido paraaminobenzoico (PABA), enquanto as diaminopirimidinas impedem a utilização do folato pela inibição da enzima diidrofolato redutase. Desta maneira, a associação de drogas destes grupos induz a um efeito sinérgico (SCHLESINGER, 1988; BRASIL, 2020; CAMARGO *et al*., 2009).

2.5.5 Primaquina

A Primaquina (PQ), droga do grupo das 8-aminoquinoleínas sintetizada em 1963, é ativa contra as fases estacionárias dos plasmódios (hipnozoítas e gametócitos) e representa o único princípio ativo com eficácia e segurança demonstrada contra as formas teciduais ou hipnozoítas das espécies *P. vivax* e *P. ovale* ainda hoje amplamente utilizada (MIHALY *et al*., 1984; LEMKE, 2008). Quanto ao mecanismo de ação, há escassez de conhecimentos, entretanto propõe-se que a droga interaja com o DNA do parasito, interferindo na sua síntese e função (OLLIARO, 2001).

2.5.6 Artemisinina e seus derivados

Em 1967, a República Popular da China começou um projeto para desenvolvimento de novos fármacos, empregando plantas nativas há tempo utilizadas na medicina tradicional. Dentre estas espécies vegetais, havia a *Artemisia annua* L. também conhecida como "*qing hao*" desde 168 a.C. e que já tinha uma longa história de uso, a princípio para tratamento de hemorroidas. Contudo, o princípio ativo somente foi isolado em 1972, denominado como *qinghaosu* (QHS), que significa princípio ativo de *"qing hao*", mas que ficou conhecido no Ocidente como Artemisinina (SCHMID e HOFHEINZ, 1983).

A Artemisinina (ART) é uma lactona sesquiterpênica que possui uma ligação endoperóxido, cujo mecanismo de ação provável é pela clivagem das pontes de peróxido e liberação de radicais livres tóxicos que destruiriam o parasito, ação esta que ocorre no vacúolo digestivo do parasito. Este composto tem diversos derivados já sintetizados, mais ou menos ativos do que o fármaco original e, entre eles, podemos citar a Diidroartemisinina (DQHS), Arteméter, Artemisiteno e Artesunato de Sódio, grupo que mantém o grupamento peróxido. Estes elementos foram descritos como endoperóxidos de primeira geração e são muito utilizados em áreas onde a resistência do parasito às drogas anteriores está disseminada, como Tailândia, China e Brasil (MESHNICK, 2001).

A ART e seus derivados possuem vantagens sobre os demais compostos, tais como pouca ou nenhuma resistência cruzada com outros antimaláricos e ação esquizonticida

sanguínea de atuação mais rápida do que outros antimaláricos. No entanto, há limitações como o curto tempo de meia-vida, biodisponibilidade baixa para formulações de uso oral e evidências de neurotoxicidade em estudos pré-clínicos (CAMARGO *et al*., 2009).

2.5.7 Tafenoquina

A Tafenoquina (TQ) é uma 8-aminoquinolina sintética, derivada da primaquina, identificada em 1978 nos Estado Unidos. Em outubro de 2019 o medicamento alcançou registro, junto a Anvisa, para uso no tratamento da malária vivax. Estudos coordenados pela Fiocruz comprovam que a droga encurta o tempo de tratamento, e desta forma pode contribuir para melhor adesão ao fármaco (FIOCRUZ, 2019).

O mecanismo de ação da TQ ainda é desconhecido, todavia sabe-se que a droga possui atividade contra os hipnozoítos e pressupõe-se, como nas demais 8-aminoquinolinas, que seu metabolismo via citocromo P450, acontece por meio de oxidases, especialmente a CYP2D6 (PYBUS *et al*., 2012), resultando em intermediários mais reativos, como os superóxidos. A tafenoquina também inibe a polimerização da hematina, podendo contribuir para sua atividade esquizonticida, fatores cruciais para atividade antimalárica e tóxica da substância (PYBUS *et al*., 2012).

2.5.8 Lumefantrina

A lumefantrina (LF) é uma droga antimalárica esquizonticida sanguíneo da classe dos quinolinometanois, como o quinina e a mefloquina, foi sintetizada primeiramente na China no final da década de 70 (CÉSAR *et al*., 2008). A ação antimalárica contra cepas de *P. falciparum* foi demonstrada *in vitro*, aliada a baixa toxicidade do fármaco (ZENG *et al*., 1996).

O provável mecanismo de ação, como as demais drogas dos quinolinometanois, está relacionado a inibição da produção de hemozoína, por ligação ao grupo heme ou pela inibição da heme polimerase (VALECHA *et al*., 2009).

2.5.9 Novas Drogas

A terapia combinada com base em Artemisinina (ACT) e seus derivados ativos é preconizada pela OMS para o tratamento de primeira escolha da malária por *P. falciparum* não-complicada. Nos últimos anos, uma nova combinação composta pela dihidroartemisinina–piperaquina vem sendo utilizada em larga escala em muitos países da Ásia e África. A Dihidroartemisinina (DQHS) é o metabólito ativo dos compostos de artemisinina (artesunato, artemeter etc.) que atua promovendo a clivagem nas pontes de endoperóxidos pelo ferro, liberando radicais livres e causando estresse oxidativo, elementos fundamentais para destruição

do parasito (ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE PEDIATRIA, 2020). Já a Piperaquina é uma bisquinolina que tem um tempo de meia-vida prolongado e demonstra ser altamente ativa frente às cepas de *P. falciparum* e *P. vivax* resistentes à Cloroquina (VENNERSTROM, *et al*., 1992). Atualmente, a dihidroartemisinina-piperaquina (DHA-PPQ) é uma combinação de fármacos de primeira escolha para tratamento de *P. falciparum* no continente africano e do sudeste asiático (WHO, 2020).

A rápida conversão da artemisinina em DHA, proporcionou a descoberta de análogos mais estáveis e potentes, destacando-se o derivado carba-C10, que demonstrou atividade *in vitro* e *in vivo* superior, além de possuir maior estabilidade e não ser convertido a DHA (BRAY *et al*., 2005).

Outro agente que vem sendo investigado quanto às suas propriedades antimaláricas contra o *P. falciparum* é a Mirincamycina – U24729A. Esta substância é um derivado da Lincomicina, o qual demonstra ser eficaz contra o *P. falciparum* em modelos experimentais. Há também relatos do efeito sinérgico desta substância em associação com a PQ em modelos animais e, atualmente, os estudos estão em fase pré-clínica (HELD *et al*., 2010).

Medicamentos já em uso para tratamento de outras patologias são apostas futuras para o enfrentamento da malária, como o azul de metileno, droga utilizada no tratamento da metahemoglobinemia. em associação com a primaquina – NCT02851108; o antibiótico Fosmidomicina associado a piperaquina – NCT02198807; o fármaco antidiabético Rosiglitazona, como terapia adjuvante para malária grave – NCT02694874; a associação tripla do Imatinibe, droga para tratamento do câncer, diidroartemisinina e piperaquina – NCT03697668; e a combinação da atovaquona-proguanil mais o Sevuparin, usado no tratamento da doença das células falciformes – NCT01442168 (TSE *et al*., 2019).

2.6 PESQUISA DE PRODUTOS NATURAIS E USO ETNOBOTÂNICO

A utilização de plantas medicinais para o tratamento de enfermidades, entre elas a malária, é prática comum feita pela população amazônica, estudo etnobotânico realizado no Estado do Amapá/Brasil, determinou que 16 espécies são utilizadas para tratamento da malária. Uma das espécies, que não apresentava estudos, a *Amasonia campestres*, foi avaliada da sua atividade *in vitro* (*P. falciparum*) e *in vivo* (*P. berghei*), onde se observou elevada redução da parasitemia e moderada atividade antiplasmódica (COSTA, 2013). Em outro estudo realizado em comunidade ribeirinha no baixo Rio Negro/AM, determinou 62 espécies vegetais de 53 gêneros e 34 famílias botânicas diferentes, eram utilizadas no tratamento da malária, e 25,8% destas, foram citadas pela primeira vez em estudos etnobotânicos realizados na América Latina para tratamento da doença (VEIGA e SCUDELLER, 2014).

Substâncias (elipticina e olivacina) oriundas de plantas amazônicas demonstraram atividade inibitória de formação da hemozoína (SILVA, 2014). A já conhecida resistência do *Plasmodium* aos derivados do quinina e a recente resistência a artemisinina associada a outras drogas observadas em países da Ásia como Mianmar, Camboja, Vietnã, Tailândia, Laos e na província de Yunnan, na China (WHO, 2016), justificam a busca por novas substâncias que possam ser utilizados como opção terapêutica.

2.7 DESCRIÇÃO BOTÂNICA DA IPECA

A ipeca (*Carapichea ipecacuanha)* também conhecida como, ipeca-verdadeira, poaia, poaia cinzenta, dentre outras, é nativa das regiões sombrias e úmidas. Possui grande prevalência em regiões de florestas tropicais da América Sul, com ocorrência no Brasil, Colômbia, Venezuela, Peru, Equador, Bolívia, Guianas e América Central. É uma espécie que pode chegar a ter até 30 cm de altura sendo reconhecida por suas propriedades farmacológicas e uso popular, inclusive para tratamento da malária (MILLIKEN, 1997; HUTHER *et al*., 2018).

A *C. ipecacuanha* (Figura 5) é um subarbusto da Família *Rubiaceae*, sua raiz apresenta coloração amareladas ou esbranquiçadas, quando são coletadas frescas, e acinzentadas, quando desidratas (SANCHEZ, 2006). Uma característica bem visível da raiz da ipeca é a torção enquanto as raízes crescem e ramificam-se com o tempo. Sua parte inferior é carnosa e fibrosa, apresentando um odor fraco, quando frescas, e um sabor amargo e nauseante (LAMEIRA, 2002).

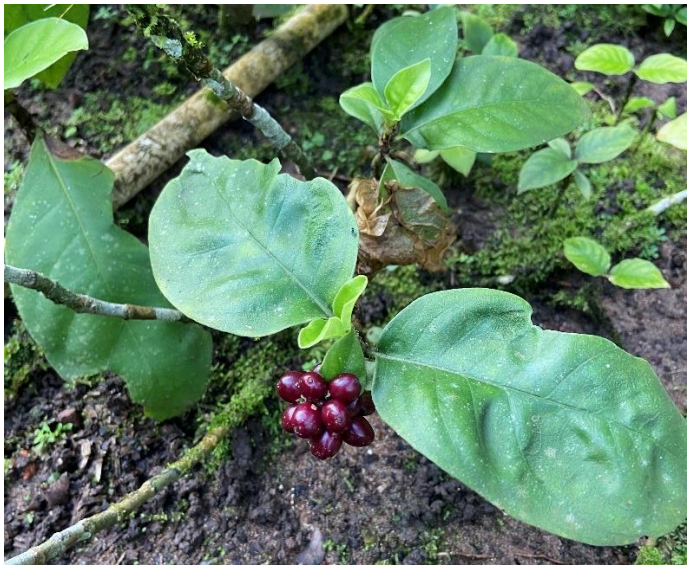


Figura 5: Planta adulta de *C. ipecacuanha*

Tem sua porção subterrânea formada por um delgado rizoma com raízes filiformes, aneladas e raízes lisas e delgadas (LAMEIRA, 2002). O rizoma se arca para cima e continua

em um caule aéreo curto cilíndrico, com 0,6 a 1,9 cm de diâmetro, e os entrenós, de 0,2 a 7,0 cm de comprimento. As folhas têm características lisas e persistentes na parte superior dos ramos, sendo elípticas-ovaladas, opostas, completas e inteiras. Sua inflorescência terminal é envolvida por brácteas ovais, agudas e lobadas de coloração esverdeada apresentando pedúnculo ereto ou deflexo com 1,2 a 3,5 cm de comprimento. As flores são hermafroditas sésseis e são encontradas em um número de 12 a 150 por inflorescência, geralmente encontradas nas colorações creme ou branca e raramente vináceas. Seu fruto é uma baga, elíptico, com 1,0 cm x 0,7 cm, apresentando epicarpo vermelho a vináceo, com duas sementes (LAMEIRA, 2002; BRASIL, 2011).

Na medicina popular a espécie é utilizada para tratamento de diarreia ocasionada por *Entamoeba histolystica* (IMU *et al*., 1994), expectorante e emética (ROSSI *et al*., 2005) e uso pela população Amazônica no tratamento da malária (MILLIKEM, 1997).

2.8 FITOQUÍMICA, USO E PROPRIEDADE FARMACOLÓGICA DA *C. ipecacuanha*

Nas raízes da *C. ipecacuanha* são encontradas várias substâncias, como: amido, açúcares, resinas, tanino, ácido málico, ácido cítrico, ácido ipecacuanhico e os alcaloides. Os alcaloides são os que estão relacionados às propriedades terapêuticas da planta (BOTERO *et al*., 2015), sendo o principal metabólito secundário, predominando a emetina, cefalina e psicotrina. A emetina é o principal princípio ativo presente em suas raízes e que pode ser produzida sinteticamente a partir da metilação da cefalina, sendo a dihidroemetina seu análogo sintético, distinta em apenas uma ligação dupla ao lado do substituinte etil (Figura 6), que confere a forma sintética menor efeito colateral, como danos cardíacos (SILVA, 2014).

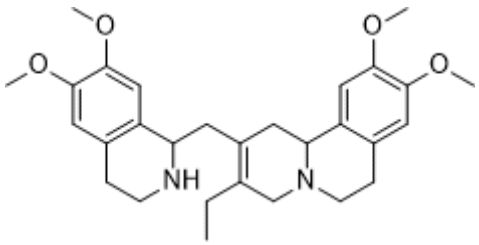


Figura 6: estrutura da dihidroemetina

Estudo envolvendo 13 populações de ipecas oriundas dos estados do RJ, BA, MG e ES, demonstrou que mais de 80% das amostras apresentaram teor de emetina superior a 1%, já os teores de cefalina em 39% das amostras foram superiores a 0,3% (MARTINS *et al*., 2009).

O efeito do cloridrato de emetina foi avaliado em hamsters infectados com *Leishmania* (Viana) *brasiliensis* submetidos ao tratamento com 03 doses intralesão (IL) de 1 mg/Kg do

alcaloide com ciclos de três semanas de repouso entre doses. Comparados ao tratamento convencional com Glucantime®, ambos tratamentos reduziram o tamanho médio das lesões (CARZOLA *et al*., 2001). O hidrato dicloridrato de emetina associado ou não à dihidroartemisinina foi submetido à avaliação da atividade antimalárica utilizando clone de *Plasmodium falciparum* (K1) multirresistente. A emetina demonstrou ser um potente inibidor do parasito, com IC50 ~ 47nM, estando associado ou não a dihidroartemisinina (MATTHEWS *et al*., 2013).

Conforme relatado, a emetina é um dos alcaloides presentes na *C. ipecacuanha* e apesar de seu uso popular na medicina tradicional no tratamento da malária e da atividade antimalárica de seu alcaloide majoritário, até o presente, nenhum estudo avaliou a atividade antimalárica de seu extrato, frações e outros alcaloides.

2.9 INTERFERÊNCIA DO AMBIENTE NA COLETA DE AMOSTRAS VEGETAIS

Os relatos sobre as normas para a coleta de plantas medicinais ocorrem desde o quarto século A.C. quando, por exemplo, os carrascos gregos coletavam as amostras do veneno cicuta (*Conium maculatum*) sempre pelo período da manhã, pois os níveis de colina eram maiores (LOPES; NETO, 2007). Outro fator que também influencia é o estresse hídrico, capaz de alterar os metabólitos secundários em plantas, pois pode levar um aumento na produção de vários tipos de metabólitos secundários (SELMAR & KLEINWÄCHTER, 2013). O déficit hídrico, por exemplo, pode alterar, de modo significativo, a produção de óleos essenciais e flavonoides, como observado no estudo realizado com *Lippia sidoides* (ALVARENGA *et al*., 2011) e estas alterações são dependentes da intensidade e da duração do estresse, além da espécie submetida (LELIS *et al*., 2016).

O excesso de chuva pode resultar na perda de substâncias hidrossolúveis nas folhas e raízes por lixiviação, sabe-se que isto é aplicado às plantas produtoras de alcaloides, glicosídeos e até mesmo óleos vegetais (EVANS, 1996). A variação na composição dos metabólitos também está associada à espécie medicinal, como observado em *Pseudobombax marginatum* e *Guapira graciliflora*, onde as concentrações dos polifenóis e dos flavonoides se mostraram diferentes nos períodos avaliados (CHAVES *et al*., 2013). O teor de alcaloides pode ocorrer pelos fatores de origem da planta, luminosidade, temperatura que é cultivada e idade da planta, sendo que na ipeca apresenta-se em maior concentração em plantas com 16 meses de idade (SILVA, 2014).

Assim, é importante avaliar o período em que uma planta está sendo coletada, pois os metabólitos secundários desta podem sofrer alteração quantitativa e qualitativa. Estas alterações podem ser atribuídas à variação de intensidade luminosa, da temperatura, da disponibilidade de

nutrientes no solo, estação climática, pluviosidade, estágio de desenvolvimento da planta e sazonalidade, sendo este último, um dos fatores que mais interferem em relação a variações dos constituintes ativos de uma espécie (MARTINS, 2012).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLINGER, N. L.; CAVA, M. P.; JONGH. D. C. de; JOHNSON, C. R.; LEBEL, N. A.; STEVENS, C. L. **Química Orgânica**. 2ª ed. São Paulo: LTC. 2017.

ASOCIACIÓN ESPANÕLA DE PEDIATRIA. **Ficha de dihidroartemisinina**: fecha de actualización. 2020. Dispponível em: < https://www.aeped.es/comite-medicamentos/pediamecum/dihidroartemisinina>. Acesso em: 10 de jan. de 2021.

AZEVEDO, M. R. Avaliação da atividade antiplasmodial de compostos sintéticos derivados de triazois e aminoquinolinas e padronização do ensaio SYBR Green para testes com drogas. **Trabalho de Conclusão de Curso** (graduação), Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais. 2018, 46 p.

BAHIA. Secretaria de Saúde. **Boletim epidemiológico da malária no Estado da Bahia**. v. 1, 2020.

BERGMANN, B. R.; COSTA, S. S.; MORAES, V. L. G. Brazilian medicinal plants: A rich source of immunomodulatory substances. **Brazilian Journal Association for the Advancement of Science.** v. 49, p 395-402, 1997.

BERO, J.; GANFON, H.; JONVILLE, M. C.; FREDERICH, M.; GBAGUIDI, F. *In vitro* antiplasmodial activity of plants used in Benin traditional medicine to treat malaria. **J. Ethnophamacol**., 133, 439-444. 2009.

BEUTLER, E. Glucose-6-Phosphate dehydrogenase deficiency: a historical perspective. **Blood**, v. 111, p.16–24, 2008.

BOTERO, C.; URREA, A.; NARANJO, E. Potencial de regeneración de *Psychotria ipecacuanha* (*Rubiaceae*) a partir de capas delgadas de células. **Acta Biológica Colombiana**, v.20, n.3, p.181-192, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. 7ª ed. Brasília: Ministério da Saúde. p. 31-54. (Série A. Normas e Manuais Técnicos) 2009.

_____. Ministério da Saúde. **Plano Nacional de Saúde 2016-2019**. Brasília: Ministério da Saúde, 2016.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. **Guia de Vigilância em Saúde**: volume único [recurso eletrônico]. 3ª. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2019.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Vigilância em saúde no Brasil 2003|2019**: da criação da Secretaria de Vigilância em Saúde aos dias atuais. Bol Epidemiol [Internet]. 2019.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim epidemiológico**: malária 2021. v. 53, nº 17, 2021.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Imunização e Doenças Transmissíveis. **Guia de tratamento da malária no Brasil**. 2ª ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2021. 84 p.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Imunização e Doenças Transmissíveis. **Elimina malária Brasil: Plano Nacional de Eliminação da Malária**. Brasília: Ministério da Saúde, 2022. 60 p.

BRASIL, P. *et al*. Outbreak of human malaria caused by *Plasmodium simium* in the Atlantic Forest in Rio de Janeiro: a molecular epidemiological investigation. **The Lancet Global Health**, v. 5, p. e1038-1046. 2017.

BRAY, P. G.; WARD, S. A.; O'NEILL, P. M. Quinolines and Artemisinin: chemistry, biology and history. **Curr Top Microbiol Immunol**., v. 295, p. 3-38, 2005.

BRITO-SOUSA, J. D. *et al.* Clinical Spectrum of Primaquine-induced Hemolysis in Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency: A 9-Year Hospitalization-based Study from the Brazilian Amazon. **Clinical Infectious Diseases**, [*s. l.*], v. 69, n. 8, p. 1440-1442, 2019.

BRUCE-CHWATT, L. J. in: WERNSDORFER, W. H. **Malaria**: Principles and Practice of Malariology.Churchill Livingstone: Edinburgh, 1989, p. 1-59.

CAPANNA, E. Grassi versus Ross: who solved the riddle of malaria? **International Microbiology**, v. 9(1), p. 69-74. 2006

CARRERA, M. **Insetos de interesse médico e veterinário**. Curitiba: Universidade Federal do Paraná. p. 13-21. 1991.

CARZOLA, D.; YÉPEZ, J.; AÑEZ, N.; MIRT, A. S. de. Efecto del tratamiento intralesional com clorhidrato de emetina sobre *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*. **Invest. Clin**. v. 42, n. 1, p. 5-21, 2001.

CELLI, A. **Storia della malaria nell'agro romano**, Academia dei Lincei: Roma, 1925.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Choosing a Drug to Prevent Malaria**. 2018. Disponível em: < https://www.cdc.gov/malaria/travelers/drugs.html>. Acesso em 27 de jun. de 2022.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Malaria diagnostic tests**: Simian malaria species confirmation service. 2020. Disponível em: <https://www.cdc.gov/malaria/diagnosis_treatment/diagnostic_tools.html#tabs-1-1>. Acesso em 07 de jan. de 2021.

CÉSAR, I. C.; NOGUEIRA, F. H. A.; PIANETTI, G. A. Simultaneous determination of artemether and lumefantrine in fixed dose combination tablets by HPLC with UV detection. **J. Pharmaceut. Biomed. Anal**., v. 48, n. 3, p. 951-954, 2008.

COMBRINCK, J. M.; MABOTHA, T. E.; NCOKASI, K. K.; AMBELE, M. A.; TAYLOR, D.; SMITH, P. J.; EGAN, T. J. Insights into the role of heme in the mechanism of action of antimalarials. ACS Chemical Biology, v. 8, n. 1, p. 133-137. 2012.

COMMONS, R. J. *et al*. The effect of chloroquine dose and primaquine on Plasmodium vivax recurrence: a WorldWide Antimalarial Resistance Network systematic review and individual patient pooled meta-analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, [*s. l.*], v. 18, n. 9, p. 1025-1034, 2018.

COSTA, E. V. M. da. Estudo etnobotânico sobre plantas utilizadas como antimaláricas no estado do amapá, avaliação da atividade antimalárica e toxicidade aguda por via oral de *Amasonia campestris* (Aubl.) Moldenke. Macapá. 2013. 142 f. **Tese** (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical – PPGBIO.

DUARTE, E. C.; PANG, L. W.; RIBEIRO, L. C.; FONTES, C. J. Association of subtherapeutic dosages of a standard drug regimen with failures in preventing relapses of vivax malaria. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, [*s. l.*], v. 65, n. 5, p. 471-476, 2001.

EGAN, T. J.; NCOKASI, K. K. Quinoline antimalarials decrease the rate of β-hematin formation. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 99, n. 7, p. 1532-1539. 2005.

FENECH, M.; MORLEY, A. A. Mesurement of micronuclei in lymphocytes. **Mutation Research**, v. 147, 29-36. 1985.

FORMAGIO, A. S. N.; VOLOBUFF, C. R. F.; SANTIAGO, M.; CARDOSO, C. A. L.; VIEIRA, M. do C.; PEREIRA, Z. V. Evaluation of antioxidant activity, total flavonoids, tannins and phenolic compounds in *Psychotria* leaf extracts. **Antioxidants**, v. 3, n. 4, p. 745-57. 2014.

FRANÇA, T. C. C.; SANTOS, M. G.; VILLAR-FIGUEIROA, J. D. Malária: Aspectos Históricos e Quimioterapia. **Química Nova**. v. 31, n. 5, p. 1271-1275, 2008.

FREY, S. G.; CHELO, D.; KINKELA, M. N.; DJOUKOUE, F.; TIETCHE, F.; HATZ, C.; WEBER, P. Artesunate-mefloquine combination therapy in acute Plasmodium falciparum malaria in young children: A field study regarding neurological and neuropsychiatric safety. **Malaria Journal**, [*s. l.*], v. 9, n. 291, 2010.

GILDER, M. E. *et al.* Primaquine Pharmacokinetics in Lactating Women and Breastfed Infant Exposures. **Clinical Infectious Diseases**, v. 67, n. 7, p. 1000-1007, 2018.

GLÓRIA, J. C.; ALMEIDA, M. E. M. de; ALVES, K. C. S.; ARAÚJO, F.; ÁVILA, R. A. M. de; NOGUEIRA, P. A.; MARIÚBA, L. A. M. Métodos para diagnóstico de Malária: Atualização e desafios. **Scientia Amazonia**. v. 7, n. 2, p. 24-31. 2018.

HUTHER, C. M.; SANTOS, C. M. P. P.; PINHO, C. F.; LAMEIRA, O. A.; MACHADO, T.

B.; PEREIRA, C. R. Influência de diferentes níveis de intensidade luminosa na atividade fotossintética e nos teores de alcaloides em ipecacuanha**.** SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AGROPECUÁRIA SUSTENTÁVEL., 9.; CONGRESSO INTERNACIONAL DE AGROPECUÁRIA SUSTENTÁVEL, 6., 2018, Viçosa. Ciência, tecnologia e inovação para o desenvolvimento agropecuário sustentável: **anais**. Viçosa: UFV, 2018.

IWU, M.; JACKSON, J.; SHUSTER, B. Medicinal plants in the fight against leishmaniasis. **Parasitology Today**; v. 10, p. 65–68. 1994.

LACERDA, M. V. G. *et al*. Postmortem characterization of patients with clinical diagnosis of plasmodium vivax malaria: To what extent does this parasite kill?. **Clinical Infectious Diseases**, [*s. l.*], v. 55, n. 8, p. e67-74, Oct. 2012.

LAMBROS, C.; VANDERBERG, J. P. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. **J. Parasitol**, 418-20. 1979.

LAMEIRA, O. A. Cultivo de ipecacuanha (*Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes). Belém: Embrapa Amazônia Oriental (**Circular Técnica, 28**), 2002.

LEITE, F. H. A.; TARANTO, A. G.; FONSECA, A. L.; VAROTTI, F. P.; NUNES, R. R.; JÚNIOR, M. C. Malária: Dos velhos fármacos aos novos alvos moleculares. **Biochemistry and Biotechnology Reports**. **2013**.

LEMKE, T. L. Antiparasitic agents In: WILLIAMS, D. A.; LEMKE, T. L.; ROCHE, V. F.; ZITO, S. W. Foye's principles of medicinal chemistry. 6 ed. Ed. Lippincott Willians & Wilkins, New York, cap. 39, 2008. P. 1084-1111

LOPES, S.; POSER, G. L.; KERBER, V. A.; FARIAS, F. M.; KONRATH, E. L.; MORENO, P.; SOBRAL, M. E.; ZUANAZZI, J. A. S.; HENRIQUES, A. T. Taxonomic significance of alkaloids and iridoid glucosides in the tribe *Psychotrieae* (Rubiaceae). **Biochem. Syst. Ecol**. v. 32, p. 1187–1195, 2004.

LOYOLA, C. C. P.; SILVA, C. J. M.; TAUIL, P. L. Controle da Malária no Brasil 1965 a 2001. **Revista Panamericana de Saúde Pública**, v. 11, p. 235-244, 2002.

MANZALI DE SÁ, I. A resistência à cloroquina e a busca de antimalariais entre as décadas de 1960 e 1980. **História, Ciências, Saúde – Manguinhos**, Rio de Janeiro, v.18, n.2, p. 407 – 430, 2011.

MATTHEWS, H.; USMAN-IDRIS, M.; KHAN, F.; READ, M.; NIRMALAN, N. Drug repositioning as a route to anti-malarial drug discovery: preliminary investigation of the *in vitro* anti-malarial efficacy of emetine dihydrochloride hydrate. **Malaria Journal**. v. 12, p.359, 2013.

MCGREADY, R. *et al.* Adverse effects of falciparum and vivax malaria and the safety of antimalarial treatment in early pregnancy: A population-based study. **The Lancet Infectious Diseases**, [*s. l.*], v. 12, n. 5, p. 388-396, May 2012.

MÉNARD, R.; TAVARES, J.; COCKBURN, I.; MARKUS, M.; ZAVALA, F.; AMINO, R. Looking under the skin: the first steps in malarial infection and immunity. **Nature Rev Microbiol**, 11: 701-712. 2013.

MIHALY, G. W.; WARD, S. A.; EDWARDS, G.; L'EORME, M.; BRECKENRIDGE, A. M. Pharmacokinetics of primaquine in man: identification of the carboxylic acid derivative as a major plasma metabolite. Br. J. Clin. Pharmacol, v. 17, v. 4, p. 441-446, 1984.

MILLIKEN, W. Plants for Malaria Plants for Fever: medicinal species in Latin America **– a bibliographic survey**. Royal Botanic Gardens Kew. 1997.

MONTEIRO, W. M. *et al*. G6PD deficiency in Latin America: systematic review on prevalence and variants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 109, n. 5, Aug. 2014.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, **J. Immunol. Methods**, 65: 55-63. 1983.

MOSSINI, S. A. G.; KEMMELMEIER, C. A árvore Nim (*Azadirachta indica* A. Juss): Múltiplos Usos. **Acta Farm. Bonaerense**, v.24, n.1, p.139-148, 2005.

NCOKAZI, K. K.; EGAN, T. J. A colorimetric high-throughput beta-hematin inhibition screening assay for use in the search for antimalarial compounds. **Anal Biochem**, 338(2):306-19, 2005.

OLIVEIRA, A. R. M. de; SZCZERBOWSKI, D. Quinina: 470 de história, controvérsias e desenvolvimento. **Química Nova**, v.32, n.7, p. 1971-1974, 2009.

OLLIARO, P. Mode of action and mechanisms of resistance for antimalarial drugs. **Pharm. Ther**., v. 89, p. 207-219, 2001.

OSEI-AKOTO, A.; ORTON, L.; OWUSU-OFORI, S. P. Atovaquone-proguanil for treating uncomplicated malaria. **Cochrane Database Syst Rev**. Oct 19;(4):CD004529. 2005.

PEIXOTO, H. M.; MARCHESINI, P. B.; DE OLIVEIRA, M. R. F. Efficacy and safety of artesunatemefloquine therapy for treating uncomplicated Plasmodium falciparum malaria: systematic review and meta-analysis. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, [*s. l.*], v. 110, n. 11, p. 626-636, 2016.

PYBUS, B. S.; *et al*. CYP450 phenotyping and accurate mass identification of metabolites of the 8-aminoquinoline, anti-malarial drug primaquine. **Malaria Journal**, v. 11, n. 259, p. . 2012.

QIGUI, L.; MILHOUS, W. K.; WEINA, P. J. **Artemisinins in malaria therapy.** New York: Nova Science Publishers. 2007.

RIECKMAN, K. H.; SAX, L. J.; CAMPBELL, G. H.; MRENA, J. F. Drug sensitivity of *Plasmodium falciparum*. An *in vitro* microtechnique. **The Lancet**, 311: 22-23. 1978.

ROSEN, G. Uma história da saúde pública: a era bacteriológica e suas consequências (1875-1950). São Paulo: Hucitec, UNESP; Rio de Janeiro: ABRASCO. p. 219-252. 1994.

ROSENTHAL, P. J. **Antimalarial chemotherapy: mechanisms of action, resistance, and new directions in drug discovery**. Totowa: MD Humana Press. 2001.

ROSSI, A. A. B.; OLIVEIRA, L. O.; VIEIRA, M. F. Distyly and variation in floral traits in natural populations de *Psychotria ipecacunha* (Brot.) Strokes (*Rubiaceae*). **Revista Brasileira de Botânica**, v.28, n.2, p. 285-294, 2005.

SOUSA, J. C.; FERREIRA, V. F. C. **Microbiologia volume III**. Lidel – edições técnicas. 2002.

SOUZA, P. F.; XAVIER, D. R.; MUTIS, M. C. S.; MOTA, J. C. da; PEITER, P. C.; MATOS,

V. P. de; MAGALHÃES, M. de A. F. M.; BARCELLOS, C. Spatial spread of malaria and economic frontier expansion in the Brazilian Amazon. **Plos one**, v. 14, n. 6, p. e0217615, 2019.

SOUZA, R. K. D.; MENDONÇA, A. C. A. M.; SILVA, M. A. P. da. Aspectos etnobotânicos, fitoquímicos e farmacológicos de espécies de *Rubiaceae* no Brasil. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**. v. 18, n. 1, 2013.

TANABE, K.; JOBART, T.; HORIBE, S.; PALACPAC, N. M.; HONMA, H.; TACHIBANA, S.; NAKAMURA, M.; HORII, T.; KISHINO, H.; MITA, T. *Plasmodium falciparum* mitochondrial genetic diversity exhibits isolation-by-distance patterns supporting a sub-Saharan African origin. **Mitochondrion**. v. 13, n. 6, p. 630-636, 2013.

TORRES, K. L.; FIGUEIREDO, D. V.; ZALLS, M. G.; DANIEL-RIBEIRO, C. T.; ALECRIM, W.; CRUZ, M. de F. F. da. Standardization of a very specific and sensitive single PCR for detection of *Plasmodium vivax* in low parasitized individuals and its usefulness for screening blood donors. **Parasitology Research**, v. 98, n. 6, p. 519-524, 2006.

TRAGER, W.; JENSEN, J. B. Human malaria parasites in continuous culture. **Science**, v. 193, n. 4254, p.673-75. 1976.

TSE, E. G.; KORSIK, M.; TODD, M. H. The past, present and future anti-malarial medicines. **Malaria Journal**, v. 18, n. 93, p.1-23, 2019.

VALE, V. V.; VILHENA, T. C.; TRINDADE, R. C. S.; FERREIRA, M. R. C.; PERCÁRIO, S.; SOARES, L. F.; PEREIRA, W. L. A.; BRANDÃO, G. C.; OLIVEIRA, A. B.; DOLABELA, M. F.; VASCONCELOS, F. de. Anti-malarial activity and toxycity assessment of Himatanthus articulatus, aplant used to treat malaria in the Brazilian Amazon. **Malaria Journal**. 14:132. 2015.

VALECHA, N; *et al*. Therapeutic efficacy of artemether-lumefantrine in uncomplicated falciparum malaria in Índia. **Malaria Journal**, v. 8, n.107, p. 1-8, 2009.

VEIGA, J. B.; SCUDELLER, V. V. Etnobotânica e medicina popular no tratamento de malária e males associados na comunidade ribeirinha Julião – baixo Rio Negro (Amazônia Central). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 17, n. 4, p. 737-747. 2014.

VENNERSTROM, J. L.; ELLIS, W. Y.; AGER, A. L.; ANDERSEN, S. L.; GERENA L.; MILHOUS, W. K. Bisquinolinas. 1. N , N- Bis (7-cloroquinolin-4-il) alcanodiaminas com potencial contra a malária resistente à cloroquina. **J Med Chem**., v. 35, p. 2129–34. 1992.

WIEGREBE, W.; KRAMER, W. J.; SHAMMA, M. The emetine alkaloids. **J. Nat. Prod**. 47, 397-408, 1984.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for the treatment of malaria**. Geneve, 2021. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

_____. **World Malaria Report 2020**. Geneva: World Health Organization; 2020. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

_____. **World Malaria Report 2021**. Geneva: World Health Organization; 2021. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

ZENG, M.; LU, Z.; YANG, S.; ZHANG, M.; LIAO, J.; LIU, S.; TENG, X. Determination of benflumetol in human plasma by reversed-phase high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. **Journal Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 681, n. 2, p. 299-306. 1996.

ZIRIHI, G. N.; MAMBU, L.; GUEDE-GUINA, F.; BODO, B.; GRELLIER, P. *in vitro* antiplasmodial activity and cytotoxicity of 33 West African plants used for treatment of malaria. **Jounal Ethnophamacology**, 98, 281-285. 2005.

CAPÍTULO I

Artigo elaborado e aceito para publicação como capítulo do livro "Avanços nos Estudos da Biodiversidade e Biotecnologia na Amazônia" (**ANEXO 1**).

Climate Influence in the Chemical Composition of Ipeca (*Psychotria ipecacuanha* Brot. Stokes) Cultivated in Belém/ PA

Influência Climática na Composição Química da Ipeca (Psychotria ipecacuanha Brot. Stokes) Cultivada em Belém/PA

Christian Neri Lameira, Afonso Rafael Nascimento e Silva, Sant' Clair Silva dos Santos, Giselle Maria Rachid Viana, Osmar Alves Lameira & Maria Fany Dolabela

ABSTRACT

Psychotria ipecacuanha is a medicinal species with great prevalence in dark and humid regionsof the tropical forests of America. It has several chemical substances such as emetine and cephalin, widely used in antidiarrheal, amoebicide, expectorant and anti-inflammatory treatment. The study aimed to to evaluate whether the qualitative chemical composition of theroots of P. ipecacuanha is influenced by rainfall and average temperature. The samples were collected during periods od greater and lesser rainfall and submitted to the washing, dehydration, grinding and extraction process in alcoholic solution, for later qualitative analysisof their secondary metabolites. The results obtained showed that the qualitative tests evidencedthe presence of alkaloids and tannins in the extracts of both periods evaluated. It was concludedthat in the evaluated period and in the methodology used there is no influence of rainfall and average temperature on the qualitative composition of secondary metabolites in roots of *P. ipecacuanha*.

Keywords: *Carapichea ipecacuanha; secondary metabolites; vegetable extract*

RESUMO

A *Psychotria ipecacuanha* é uma espécie medicinal com grande prevalência em regiões sombrias e úmidas das florestas tropicais da América. A mesma possui diversas substâncias químicas, como a emetina e cefalina, bastante utilizadas no tratamento antidiarreico, amebicida,expectorante e anti-inflamatório. O estudo objetivou avaliar se a composição química qualitativa das raízes de *P. ipecacuanha* sofre influência da precipitação pluviométrica e temperatura média. As amostras foram coletadas durante os períodos de maior e menor precipitação pluviométrica e submetidas ao processo de lavagem, desidratação, moagem e extração em solução alcoólica, para posterior análise qualitativa de seus metabólitos secundários. Os resultados obtidos demonstraram que os ensaios qualitativos evidenciaram a presença de alcaloides e taninos nos extratos em ambos os períodos avaliados. Concluiu-se queno período avaliado e na metodologia utilizada não ocorre influência da precipitação pluviométrica e da temperatura média sobre a composição qualitativa de metabólitos secundários em raízes de *P. ipecacuanha*.

Palavras-chaves: *Carapichea ipecacuanha; metabólitos secundários; extrato vegetal*

Introdução

O hábito de usar plantas com finalidade terapêutica é tão antigo quanto à espécie humana. Ao longo da história, a humanidade sempre buscou amenizar suas dores ou tratar suasmoléstias através da ação dos princípios ativos existentes nas plantas, muitas vezes de modo empírico ou por descobertas ao acaso (LAMEIRA; PINTO, 2008). Uma grande parcela da população ainda não tem acesso aos serviços de saúde básica e nem aos medicamentos essenciais, isso acontece principalmente em países emergentes como o Brasil. Desta forma, a baixa renda e o difícil acesso a estes

medicamentos, tornam as plantas medicinais como uma alternativa terapêutica principal para muitas comunidades. Assim, desde 1999, a World Health Organization (WHO) vem publicando monografias selecionadas de plantas medicinais a fim decontribuir com o uso e pesquisa sobre as mesmas (WHO, 2005).

A ipeca (*Psychotria ipecacuanha)* também conhecida como, ipeca-verdadeira, poaia, poaia cinzenta, dentre outras, é nativa das regiões sombrias e úmidas. Possui grande prevalênciaem regiões de florestas tropicais da América Sul, com ocorrência no Brasil, Colômbia,Venezuela, Peru, Equador, Bolívia, Guianas e também na América Central. É uma espécie quepode chegar a ter até 30 cm de altura sendo reconhecida por suas propriedades farmacológicase uso popular (HUTHER *et al*., 2018).

A *P. ipecacuanha* (Figura 1) é um subarbusto da Família *Rubiaceae,* sua raiz apresentacoloração amareladas ou esbranquiçadas, quando são coletadas frescas, e acinzentadas, quando desidratas (SANCHEZ, 2006). Uma característica bem visível da raiz da ipeca é a torção enquanto as raízes crescem e ramificam-se com o tempo. Sua parte inferior é carnosa e fibrosa,apresentando um odor fraco, quando frescas, e um sabor amargo e nauseante (LAMEIRA, 2002).

Seus ramos aéreos, emitidos a partir de nós em seu rizoma, são cilíndricos, com 0,6 a 1,9 cm de diâmetro, e os entrenós, de 0,2 a 7,0 cm de comprimento. As folhas têm característicaslisas e persistentes na parte superior dos ramos, ovais, elípticas e oblongadas. Sua inflorescênciaterminal é envolvida por brácteas ovais, agudas e lobadas de coloração esverdeada apresentandopedúnculo ereto ou deflexo com 1,2 a 3,5 cm de comprimento. As flores são hermafroditas sésseis e são encontradas em um número de 12 a 150 por inflorescência, geralmente encontradasnas colorações creme ou branca e raramente vináceas. Seu fruto é uma baga, elíptico, com 1,0 cm x 0,7 cm, apresentando epicarpo vermelho a vináceo, com duas sementes (BRASIL, 2011).

Figura 1. Planta adulta de *P. ipecacuanha*

Autor: Osmar Lameira

Seu centro de origem é o Brasil, onde pode ser encontrada na floresta, sob árvores de grande porte, nos Estados de Mato Grosso, Rondônia, Pará, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Espírito Santo, Pernambuco e Bahia (OLIVEIRA *et al*., 2010). É uma espécie ameaçada de erosão genética e extinção, ocasionada pelo processo de extrativismo nos dois séculos passados,ocasionando abertura de novas fronteiras agrícolas. Devido à ipeca ser uma espécie de fácil adaptação a um sistema de cultivo economicamente viável, a planta também é utilizada como modelo para o estudo de sistemas economicamente aproveitáveis da biodiversidade em áreas florestais que estão sobre alta pressão econômica (ROCHA; LAMEIRA, 2011).

Nas raízes da *P. ipecacuanha* são encontradas várias substâncias, como: amido, açúcares, resinas, tanino, ácido málico, ácido cítrico, ácido ipecacuanhico e os alcaloides. Os alcaloides são os que estão relacionados às propriedades terapêuticas da planta, como: antidiarreico, amebicida,

expectorante e anti-inflamatório (BOTERO *et al*., 2015). Os alcaloides são o principal metabólito secundário, sendo predominante a emetina, cefalina e psicotrina. Os metabólitos secundários são moléculas ativas de uma planta que podem possuir diversas funções, entre elas a medicamentosa. Estes são extraídos e purificados de uma planta à produção de um medicamento. Para validar uma espécie como medicinal é necessário realizar vários estudos como o botânico, o químico e os farmacológicos (BRANDÃO, 2009). A emetinaé o principal princípio ativo presente em suas raízes a mesma também pode ser produzida sinteticamente a partir da metilação da cefalina, sendo a dihidroemetina seu análogo sintético, distinta em apenas uma ligação dupla ao lado do substituinte etil, que confere a forma sintéticamenor efeito colateral (SILVA, 2014).

Os relatos sobre as normas para a coleta de plantas medicinais ocorrem desde o quarto século a.C. quando, por exemplo, os carrascos gregos coletavam as amostras do veneno cicuta (*Conium maculatum*) sempre pelo período da manhã, pois os níveis de colina eram maiores (LOPES; NETO, 2007). Outro fator que também influencia é o estresse hídrico, capaz de alterar os metabólitos secundários em plantas, pois pode levar um aumento na produção de vários tipos de metabólitos secundários (SELMAR; KLEINWÄCHTER, 2013). O déficit hídrico, por exemplo, pode alterar de modo significativo a produção de óleos essenciais e flavonoides, comoobservado no estudo realizado com *Lippia sidoides* (ALVARENGA *et al*., 2011) e estas alterações são dependentes da intensidade e da duração do estresse, além da espécie submetida(LELIS *et al*, 2016).

O excesso de chuva pode resultar na perda de substâncias hidrossolúveis nas folhas e raízes por lixiviação, sabe-se que isto é aplicado às plantas produtoras de alcaloides, glicosídeose até mesmo óleos vegetais (EVANS, 1996). A variação na composição dos metabólitos também está associada a espécie medicinal, como observado em *Pseudobombax marginatum* e*Guapira graciliflora*, onde as concentrações dos polifenóis e dos flavonoides se mostraram diferentes nos períodos avaliados (CHAVES *et al*., 2013). O teor de alcaloides pode ocorrer pelos fatores de origem da planta, luminosidade, temperatura que é cultivada e idade da planta,sendo que na ipeca apresenta-se em maior concentração em plantas com 16 meses de idade (SILVA, 2014).

Assim, é importante avaliar o período em que uma planta está sendo coletada, pois os metabólitos secundários desta podem sofrer alteração quantitativa e qualitativa. Estas alterações podem ser atribuídas à variação de intensidade luminosa, da temperatura, da disponibilidade de nutrientes no solo, estação climática, pluviosidade, estágio de desenvolvimento da planta e sazonalidade, sendo este último, um dos fatores que mais interferem em relação a variações dos constituintes ativos de uma espécie (MARTINS, 2012).

Sabe-se que uma grande parcela de todos os princípios ativos utilizados na terapêutica é extraída de produtos naturais, principalmente de espécies comumente utilizadas pela população na medicina tradicional. Os extratos são preparações encontradas em variadas consistências, obtidas a partir de matérias-primas vegetais desidratadas e preparadas porpercolação, maceração, infusão ou outro método adequado e validado, utilizando como solventeetanol, água ou outro adequado (BRASIL, 2019).

Os extratos são soluções concentradas obtidos a partir do contato da droga vegetal comum solvente, à temperatura ambiente ou não, por tempo determinado de acordo com a espécie utilizada (BRASIL, 2019). Em um primeiro momento ocorre a separação das substâncias ativas pela ação do solvente, onde são retiradas parcial ou totalmente da matéria prima vegetal. No segundo momento, pode ser realizada a concentração deste extrato por meio da eliminação do solvente utilizado no início do processo, comumente feito por rotaevaporação (SANTOS, 2013). Os extratos naturais são competitivos em relação aos sintéticos, pois são elaborados utilizando fontes naturais, além de possuírem qualidades sensoriais mais próximas às suas matrizes vegetais de origem (MEIRELES, 2003).

A análise fitoquímica é importante principalmente quando não são conhecidas as substâncias químicas presentes nas espécies utilizadas pela medicina popular. O principal objetivo

dessa análise é conhecer estes compostos e avaliar a presença de grupos de metabólitossecundários relevantes na qualidade da planta medicinal (SIMÕES *et al*., 2004).

Diante disso o objetivo do presente trabalho foi avaliar se a composição química qualitativa das raízes de *P. ipecacuanha* cultivada no horto de plantas medicinais da Embrapa Amazônia Oriental sofre influência durante os períodos de maior e menor precipitação pluviométrica e temperatura média.

Metodologia

As amostras utilizadas constituíram-se das raízes da espécie *P. ipecacuanha*. O materialfoi coletado no horto de plantas medicinais da Embrapa Amazônia Oriental, na cidade de Belém, no estado do Pará, em dois períodos, abril e outubro de 2018. Uma amostra do materialvegetal foi analisada pelo botânico Jair da Costa Freitas e uma exsicata depositada no HerbárioIAN da Embrapa Amazônia Oriental, exsicata IAN 197984. A espécie foi identificada como *Carapichea ipecacuanha* (Brot.) L. Anderson, família *Rubiaceae*, sendo *P. ipecacuanha* uma sinonímia à espécie.

Dados Climáticos

Os dados climáticos foram obtidos na estação de climatologia (Longitude: 48º 27' WGre Altitude: 12,8 m) da Embrapa Amazônia Oriental em Belém/PA, conforme a Tabela 1.

Tabela 1: Dados mensais de temperatura média (ºC) e precipitação pluviométrica (mm) obtidos em 2019 na estação agrometeorológica da Embrapa Amazônia Oriental.

Mês	T	Pp
Jan	26,3	387,1
Fev	26,2	426,8
Mar	26,3	622,2
Abr	26,7	454,4
Mai	27,0	324,7
Jun	27,1	211,9
Jul	27,0	156,6
Ago	27,2	137,2
Set	27,7	182,2
Out	27,5	204,4
Nov	27,6	220,4
Dez	27,5	346,1

T – Temperatura média, ºC
Pp – Precipitação pluviométrica, mm

Obtenção dos Extratos

Em cada período avaliado foi coletado em torno de 840g das raízes, que em seguida foram lavadas e retirado o excesso de água com papel toalha. Em seguida foram fragmentadase levadas à estufa de secagem à temperatura de 60º C. O material foi pesado a cada 2 horas atéque o peso de tornasse constante. Obtendo-se 154g ao final do processo. Posteriormente o material foi triturado e passado no tamis até a obtenção de pó. Pesou-se 100g do pó, transferiu-se para frasco âmbar e adicionou-se 1000 mL da solução hidroalcoólica a 70%. O macerado ficou a temperatura ambiente por 10 dias, protegido da luz e da umidade. Ao final, todo o macerado foi filtrado e obtendo-se 760 mL de extrato.

Prospecção Fitoquímica

Para os experimentos foram utilizadas técnicas simples, rápidas e seletivas para determinação dos diferentes metabólitos secundários, os quais são baseados em reações químicas que resultam no aparecimento de cor ou precipitado nas amostras analisadas.

Para pesquisa de taninos, a técnica utilizada foi a reação colorimétrica pela adição de cloreto férrico ($FeCl_3$) (adaptado). Onde 2 mL do extrato hidroalcoólico foi homogeneizado com 10 mL de água destilada e posteriormente adicionadas 1-2 gotas de solução alcoólica a 1%de $FeCl_3$. Onde se observa a formação de precipitado verde que evidencia a sua presença (SOCIEDADE BRASILEIRA DE FARMACOGNOSIA, 2009).

A identificação de saponinas é realizada pela técnica qualitativa de espuma (adaptado).Para análise é adicionado 2 mL do extrato hidroalcoólico em um tubo de ensaio com tampa, posteriormente adiciona-se 1 mL de álcool a 80% e depois 12 mL de água destilada. Em seguida, agita-se vigorosamente o tubo durante 15 segundos. A formação de espuma estável por mais de 30 minutos é indicativa da presença do metabólito secundário (SOCIEDADE BRASILEIRA DE FARMACOGNOSIA, 2009).

Para a identificação de alcaloides, a técnica realizada foi a de detecção por meio dos reativos gerais de alcaloides (RGA) – Bouchardat/Wagner (adaptado). Cerca de 2 mL de extrato foi homogeneizado com 4 mL de HCl a 5% e levado ao banho-maria. Os reagentes de Mayer eWagner foram então adicionados à mistura. Considera-se a turbidez do precipitado resultante como presença de alcaloides (SOCIEDADE BRASILEIRA DE FARMACOGNOSIA, 2009).

A identificação dos flavonoides se deu a partir da reação de Shinoda (adaptado). 1 mL do extrato, foi adicionado 1 mL de solução de acetato de chumbo a 10%. Observa-se a presença de flavonoides pela formação de precipitado amarelo (SOCIEDADE BRASILEIRA DE FARMACOGNOSIA, 2009).

A pesquisa de cumarinas, ocorre a partir da dissolução de 2 mg do resíduo em 5 mL deéter etílico. Concentrar até 0,5 mL em banho-maria. Gotejar a solução etérea em papel de filtro,de modo a formar manchas de 1 cm cada. Em seguida, adicionar uma gota de NaOH 1N. Cobrira metade da mancha com papel escuro e expor à luz UV. A reação positiva é indicada pela fluorescência azul na parte exposta (SOCIEDADE BRASILEIRA DE FARMACOGNOSIA, 2009).

Para a identificação de catequinas, dissolveu-se 2 mg do resíduo em 3 mL de metanol, caso necessário filtrar. Adicionou-se 1 mL de solução aquosa de vanilina 1% e 1 mL de HCl concentrado. A formação de coloração vermelha intensa indica reação positiva (SOCIEDADE BRASILEIRA DE FARMACOGNOSIA, 2009).

Para a identificação de terpenos, cerca de 2 mL do extrato orgânico foram dissolvidos em 2 mL de clorofórmio e evaporados até à secura. Foi adicionado então 2 mL de ácido sulfúrico concentrado e aquecido durante 2 minutos. O desenvolvimento de uma cor acinzentada indica a presença de terpenoides (SOCIEDADE BRASILEIRA DE FARMACOGNOSIA, 2009).

Resultados e Discussão

Na identificação dos compostos químicos no extrato alcoólico líquido, foi possível observar a presença de alcaloides e taninos nos ensaios realizados (Tabela 2).

Tabela 2 - Prospecção fitoquímica da raiz da *Psychotria ipecacuanha*, do banco ativo de germoplasma (BAG) da Embrapa Amazônia Oriental, coletadas em períodos com maior e menor precipitação (ppt) pluviométrica.

Prospecção fitoquímica	AMOSTRAS					
	Menor ppt pluviométrica			**Maior ppt pluviométrica**		
	1	**2**	**3**	**1**	**2**	**3**
Alcaloides	+	+	+	+	+	+
Carboidratos	-	-	-	-	-	-
Catequinas	-	-	-	-	-	-
Cumarinas	-	-	-	-	-	-
Flavonoides	-	-	-	-	-	-
Taninos	+	+	+	+	+	+
Terpenos	-	-	-	-	-	-
Saponinas	-	-	-	-	-	-

(+) = Presente; (-) = Ausente

A região Amazônica é caracterizada por períodos climatológicos distintos: período commaior precipitação pluviométrica, de transição e o período com menor precipitação, estudo queavalia os efeitos de longo prazo do desmatamento progressivo da Amazônia sobre a precipitação no Brasil, revelam que em qualquer projeção os maiores índices pluviométricos ocorrem no primeiro quadrimestre do ano, com maior pico em março, e nos dois últimos meses do ano, com índices superiores a 7mm/dia (AMORIM *et al*., 2019). No presente estudo observa- se que no primeiro quadrimestre de 2019 a precipitação foi superior a 12mm/dia. Nestes mesesa diferença chegou a ser superior a 45% de precipitação pluviométrica. Durante o período de menor precipitação os índices não foram inferiores a 4,5mm/dia, e comparando os períodos decoleta (abril e outubro) a diferença chegou a ser superior 122% de precipitação. Entretanto estasdiferenças na precipitação não interferem, de modo qualitativo, no metabolismo da planta, poisnos períodos avaliados os resultados das análises mostram-se semelhantes. Para Bastos *et al*. (1993) a chuva influencia diretamente nos estágios de desenvolvimento das plantas, bem comonos processos de produção vegetal e na organização do espaço, diferentemente do observado por Monteiro *et al*. (2019) em seus estudos com café (*Coffea arabica*), onde a restrição hídrica favoreceu o acúmulo de aminoácidos, fato não observado na concentração de compostos fenólicos.

No estudo fitoquímico qualitativo realizado, observou-se a presença de alcaloides e taninos, resultado semelhante ao verificado por Lameira (2002), onde relata que na raiz de ipecasão encontrados metabolitos secundários com grande finalidade farmacológica, entre eles, os alcaloides e os taninos. O resultado caracteriza que a sazonalidade não altera qualitativamente a produção de metabolitos secundários da ipeca. Nos estudos conduzidos por Duarte (2006), considerando os efeitos da sazonalidade das amostras oriundas da Embrapa Amazônia Orientale cultiva no Rio de Janeiro e usando o método de ressonância magnética nuclear de alta resolução, observou que no outono houve uma maior quantidade de alcaloides (1,84% de cefalina e 0,63% de emetina), o que pode caracterizar como a melhor época para se coletar a planta. Fato que talvez não se observe em nosso estudo, pois na região sudeste as quatro estações climáticas são bem definidas, diferentemente das condições encontradas na região Norte.

Nas análises de identificação dos demais metabolitos secundários são semelhantes aos observados por Lameira (2002), Duarte (2006) e Viegas *et al*., (2014), que não relatam em seusestudos a presença destes, isto nos leva a crer que tanto as condições ambientais, quanto o cultivo não alteram

a fisiologia da espécie que poderia acarretar o surgimento de novos metabólitos. Para Larcher (2000) a brotação da *P. ipecacuanha*, há uma relação entre as condições climáticas e a percentagem dela, visto que há um mecanismo de regulação que evitaa brotação em condições desfavoráveis.

A temperatura média máxima e mínima do ar, no período chuvoso foi 32,01 ºC e 23,45ºC e no período de estiagem 35,1 ºC e 22,7 ºC. Em regiões úmidas o seu desenvolvimento é mais acentuado em relação às regiões secas, pois sua espécie exige um equilíbrio entre a temperatura e umidade do ar, ou seja, a espécie necessita da troca de água com a atmosfera e osolo para que ocorra o bom Índice de velocidade de brotação (IVB) da mesma. O trabalho conduzido por Coelho *et al*., (2013) mostraram que durante um período de sete dias, temperaturas abaixo de 25°C em experimento na fase de campo, ocasionam danos às estacas deraiz da ipeca. A estratificação das estacas em baixas temperaturas inibe a formação de raízes eimpede a brotação. Segundo LAMEIRA (2002), a ipeca é uma planta que se propaga em determinadas condições, e a temperatura elevada é um exemplo de condições energéticas que a espécie exige e tolera bem. No entanto, os fatores endógenos também influenciam na sobrevivência das estacas, como por exemplo, o teor de carboidrato (DIAS *et al*., 2013).

Conclusão

No período avaliado e na metodologia utilizada não ocorre influência da precipitação pluviométrica e da temperatura média sobre a composição qualitativa de metabólitos secundários em raízes de ipecacuanha.

Referências Bibliográficas

ALVARENGA, I. C. A.; VALADARES, R. V.; MARTINS, E. R.; OLIVEIRA, F. G.; FIGUEIREDO, L. S. de.; KOBAYASHI, M. K. Water stress before harvest of pepper-rosmarin. **PesquisaAgropecuária Brasileira**, v. 46, n. 7, p. 706-711, 2011.

AMORIM, T. X.; SENNA, M. C. A.; CATALDI, M. Impactos do desmatamento progressivo da Amazônia na precipitação do Brasil. **Revista Brasileira de Climatologia**, v.24, n.15, p. 151-174, 2019.

ARGENTA, C. S.; ARGENTA, C. L.; GIACOMELLI, R. S.; CEZAROTTO, S. V. Plantas medicinais: cultura popular versus ciência. Vivências: **Revista Eletrônica de Extensão da URI**, v. 7, n. 12, p. 61-60, 2011.

ASSIS, M. C. GIULIETTI, A. N. Diferenciação morfológica e anatômica em populações de "ipecacuanha" - *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes (*Rubiaceae*). **Revista Brasileira de Botânica**, v.22, n.2, p. 205-2016, 1999.

BASTOS, T. X.; SANTOS, A. R. A.; SÁ, T. D. de A.; SANTOS, A. R. dos; OLIVEIRA, R. P.; PACHECO, N. A.; KOBAYASHI, L. T. Flutuação das chuvas no nordeste paraense e sua implicação para o calendário agrícola. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE AGROMETEOROLOGIA, 8., Porto Alegre, 1993. **Anais...** Porto Alegre, 1993.

BOTERO, C.; URREA, A.; NARANJO, E. Potencial de regeneración de *Psychotria ipecacuanha* (*Rubiaceae*) a partir de capas delgadas de células. **Acta Biológica Colombiana**, v.20, n.3, p.181-192, 2015.

BRANDÃO, M. D. G. L. **Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Minas Gerais: Museu de História Natural e Jardim Botânico; 2009.

BRASIL.-Ministério da Saúde. **Farmacopeia Homeopática Brasileira**. 3ª Ed. Agência Nacional de Vigilância Sanitária: Brasília. 2011 p364.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução de Diretoria Colegiada – RDC 298, de 12 de agosto de 2019** – dispõe sobre a aprovação da Farmacopeia Brasileira, 6ª edição. Brasília. 2019.

CHAVES, T. P.; SANTANA, C. P.; VÉRAS, G.; BRANDÃO, D. O.; FELISMINO, D. C.; MEDEIROS, A. C. D.; TROVÃO, D. M. B. M. Seasonal variationin the production ofsecondary metabolites and antimicrobial activity of two plant species used in Brazilian traditional medicine. **African Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 8, p. 847-853. 2013.

COELHO, M. de F.; TEIXEIRA, V. A.; AZEVEDO, R. A. B.; ALBUQUERQUE, M. C. de F. E. Propagação da poaia (*Psychotria ipecacuanha*) em diferentes substratos e posicionamento das estacas. **Horticultura Brasileira**, v. 31, n. 3, p. 467-471, 2013.

COSTA, M. P. da; PINTO, J. E. B. P.; FRANÇA, S. de C.; LAMEIRA, O. A.; CONCEIÇÃO, H. C.; SANTIAGO, E. J. A. de. Crescimento e teor de emetina em plantas de ipeca (*Cephaelisipecacuanha* A. Richard.) obtidas *in vitro* e submetidas às condições de soluções nutritivas emcasa de vegetação. **Ciências Agrotécnicas,** v.24 (1): 47-53, 2000.

DIAS, J. P. T.; TAKATA, W. H. S.; TAKAHASHI, K.; ONO, O. E. Propagação de figueira com estacas de diferentes diâmetros. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, v.7,n.1, p. 52-57, 2013.

DUARTE, M. C. T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas noBrasil. **Revista MultiCiência**, n. 7, 2006.

EVANS, W. C. **Trease and Evans' Pharmacognosy**, 14th ed., WB Saunders Company:London, 1996.

HUTHER, C. M.; SANTOS, C. M. P. P.; PINHO, C. F.; LAMEIRA, O. A.; MACHADO, T. B.; PEREIRA, C. R. Influência de diferentes níveis de intensidade luminosa na atividade fotossintética e nos teores de alcaloides em ipecacuanha**.** SIMPÓSIO BRASILEIRO DEAGROPECUÁRIA SUSTENTÁVEL., 9.; CONGRESSO INTERNACIONAL DE AGROPECUÁRIA SUSTENTÁVEL, 6., 2018, Viçosa. Ciência, tecnologia e inovação para odesenvolvimento agropecuário sustentável: **anais**. Viçosa: UFV, 2018.

JHA, S.; SAHU, N. P.; MAHATO, B. Production of the alkaloid's emetine and cephaeline in callus cultures of *Cephaelis ipecacuanha*. **Planta Médica,** v. 54, p. 504-506, 1988.

LAMEIRA, O. A. Cultivo da Ipecacuanha [*Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes]. **Circular técnica Embrapa**, 2002.

LAMEIRA, O. A; PINTO, J. E. B. P. **Plantas medicinais**: do cultivo, manipulação e uso à recomendação popular. Belém: Embrapa Amazônia Oriental. 2008.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegeta**l. São Carlos: RiMa Artes e Textos. 2000, p. 531.

LELIS, R. T.; FREITAS, S. P.; PRINS, C. L.; FERRAZ, T. M.; CAMPOSTRINI, E.; ARANTES, M. B. S.; VIEIRA, I. J. C. Teores de óleo essencial e citral, capacidade fotossintética e crescimento em capim limão (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf.) sob estresse hídrico. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.18, p. 747-754, 2016.

LOPES, N. P.; NETO, G. N. plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, vol. 30, n.2, 374-381, 2007.

MARTINS, F. M. M. **Estudo da Influência de Fatores Ambientais na Composição Químicae Atividades Biológicas de *Xylopia sericea* St. Hill.** 2012, 88 p., Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Tropical) – Universidade Federal do Espírito Santo, São Mateus, 2012.

MEIRELES, M. A. A. Supercritical extraction from solid: process design data (2001–2003).
Current Opinion in Solid State and Materials Science, v.7, p.321–330, 2003.

MONTEIRO, G. B.; CATARINO, I. C. A.; TORRES, L. M. B.; SILVA, E. A. da. Acúmulo de compostos fenólicos e aminoácidos livres em folhas de *Coffea arabica* L. submetidos a elevadaconcentração atmosférica de CO2 e déficit hídrico. **X Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil**. Vitória. 2019.

OLIVEIRA, L. O.; VENTURINI, B. A.; ROSSI, A. A. B.; HASTENREITER S. S. Clonal diversity and conservation genetics of the medicinal plant *Carapichea ipecacuanha* (*Rubiaceae*). **Genetics and Molecular Biology**, v. 33, p. 86-93, 2010.

OTONI, W.C; SILVA, M.L.; AZEVEDO, A.A.; CARVALHO, I.F.; ROSSI, A. A. B.; CASTRILLON, S. I. Morfoanatomia dos sistemas gemíferos de poaia (*Carapicheaipecacuanha* (Brot.) L. Andersson) – Rubiaceae. **Revista Fitos**, v.9, n.1, p. 9-17, 2015.

ROCHA, T. T; LAMEIRA, O. A. Avaliação do período de floração e frutificação do BAG ipecacuanha. **15° Seminário de Iniciação Científica da EMBRAPA**. Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA, 2011.

SÁNCHEZ, R. A. O. Ipecacuanha, *Psychotria ipecacuanha* (Brotero) Stokes: Un producto nomaderable cultivado bajo el bosque em Huetar Norte, Costa Rica. In: Riquezas del bosque: frutas, remédios y artesínias em américa latina center for international forestry research. (SantaCruz-Bolívia). **Anais**. 65-68. 2006.

SANTOS, P. L.; PRANDO, M. B.; MORANDO, R.; PEREIRA, G. V. N.; KRONKA, A. Z. Utilização de extratos vegetais em proteção de plantas. **Enciclopédia Biosfera**. v. 9, n. 17, p. 2562-76, 2013.

SELMAR, D.; KLEINWÄCHTER, M. Influencing the product quality by deliberately applyingdrought stress during the cultivation of medicinal plants. **Industrial Crops and Products**, n. 42, v.4, p. 558-566, 2013.

SILVA, M. L. **Cultivo agroflorestral de *Psychotria Ipecacuanha* (Brot.) Stokes no Território do Baixo Sul da Bahia**. 2014, 75 p., Dissertação (Mestrado Acadêmico emRecursos Genéticos Vegetais) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2014.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, P. E.; GOSMANN, G.; MELLO, P. C. J.; MENTZ, A. L.; PETROVICK, R. P. **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFSC, 2004. 1102p.

SKORUPA, L. A.; ASSIS, M. C. Collecting and conserving ipecac (*Psychotria ipecacuanha*, *Rubiaceae*) germplasm in Brazil. **Economic Botany**.v. 52, p. 209-210, 1998.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE FARMACOGNOSIA. 2009. Curitiba, PR. Disponível em: http://www.sbfgnosia.org.br/Ensino/index.html. [Acesso em: 10 de janeiro, 2019].

TAYLOR, C. M.; GEREAU, R. The Genus *Carapichea* (*Rubiaceae*, *Psychotrieae*). **Annals of the Missouri Botanical Garden**. v. 99, p. 100-127. 2013.

VEGGI, P. C. **Obtenção de extratos vegetais por diferentes métodos de extração: estudo experimental e simulação dos processos**. 2009, 143 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, 2009.

VIÉGAS, I de J. M; GALVÃO, J. R; SILVA JUNIOR, M. L. da; MELO, N. C; OLIVEIRA, M. S. de. Crescimento, composição mineral e sintomas visuais de deficiência nutricional emipeca. **Revista Caatinga.** 27 (1): 141–147. 2014.

WATERMAN, P. G.; MOLE, S. **Analysis of phenolic plant metabolites**, 1st ed., BlackwellScientific Publications: Oxford, 1994.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO monographs on selected medicinal plants.** vol 4, WHO Library Cataloguing-in-Publication Data: Salermo-Paestum, 2005.

CAPÍTULO II

Artigo publicado como capítulo do livro "Pesquisa em Saúde & Ambiente na Amazônia: perspectivas para sustentabilidade humana e ambiental na região (**ANEXO 2**)".

CONTRIBUIÇÕES DAS PLANTAS MEDICINAIS PARA O TRATAMENTO DA MALÁRIA: UM REFERENCIAL TEÓRICO

Christian Neri Lameira, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia –Rede Bionorte/Polo Pará.

Marinete Marins Póvoa, Instituto Evandro Chagas - IEC/SVS/MS e Programa de Pós-Graduação em Biologia dos Agentes Infecciosos e Parasitários – PPGBAIP.

Salma Gomes de Oliveira(*in memorian*), Instituto Evandro Chagas – IEC/SVS/MS. Nathália Nogueira Chamma Siqueira, Instituto Evandro Chagas – IEC/SVS/MS.José Maria de Souza Nascimento, Instituto Evandro Chagas – IEC/SVS/MS. José Mário Veloso Peres, Instituto Evandro Chagas – IEC/SVS/MS.

Maria Fani Dolabela, Universidade Federal do Pará – UFPA. Giselle Maria Rachid Viana, Instituto Evandro Chagas – IEC/SVS/MS.

RESUMO

A malária é uma doença infecciosa causada por parasitos do gênero *Plasmodium*, ocorrendo, em 2020, 133.837 casos autóctones de malária somente na Amazônia brasileira. Acervo de fármacos está comercialmente disponível para o tratamento da doença. Contudo, alerta-se para a emergência e disseminação de resistência a grande parte dos esquemas terapêuticos disponíveis, em especial relacionado ao *P. falciparum*. Sendo assim, buscar alternativas terapêuticas é urgente e crucial para mitigar este cenário, sendo as plantas importantes fontes de fármacos antimaláricos, sobretudo, os espécimes vegetais ricos em alcaloides. Dentre estas espécies, pode-se citar a *Amasonia campestres*, que demonstrou elevada redução da parasitemia e moderada atividade antimalárica nos estudos *in vitro* e *in vivo* realizados, além da *Cinchona ledgeriana*, *Keetia leucanta*, *Morinda moridoides* e *Carapichea ipecacuanha* (Brot.) L. Andersson, espécie que merece atenção especial, dentre outras**.** A *Carapichea ipecacuanha* já é utilizada na medicina tradicional para o tratamento da malária e o alcaloide emetina é o principal princípio ativo presente nas raízes da *C. ipecacuanha*, podendo ser produzido sinteticamente a partir da metilação da cefalina**.** Porém, apesar destes achados promissores, ainda há escassez de estudos para avaliação da atividade antimalárica do extrato desta planta, assim como das frações e/ou outros alcaloides até o momento. Assim, necessita-se urgentemente ampliar as pesquisas sobre o desenvolvimento técnico e tecnológico de fármacos de origem vegetal visando, principalmente, a síntese de novos princípios ativos a partir de protótipos vegetais oriundos da flora encontrada no bioma brasileiro, em especial, da região Amazônica.

Palavras-chave: Fármaco, Resistência, *P. falciparum*, *Carapichea ipecacuanha*.

INTRODUÇÃO: MALÁRIA, UM BREVE HISTÓRICO

A malária é uma doença infecciosa causada por um parasito unicelular do gênero *Plasmodium* (BRUCE-CHWATT, 1980), cuja transmissão ocorre de forma vetorial pela fêmea de mosquitos culicídeos do gênero *Anopheles* (FORATTINI, 2002). Hipócrates foi o primeiro a detalhar as febres intermitentes da malária e associar a doença com o meio ambiente, em especial aos corpos d'água. Os romanos fizeram a mesma correlação, pois acreditavam que as pessoas eram infectadas quando respiravam o ar dos pântanos, assim o termo malária surgiu do latim "*mal* – mau' e '*aria* – ar". Posteriormente, os franceses associaram a malária ao termo "paludismo" (pântano) (BRUCE-CHWATT, 1988; FRANÇA, SANTOS, FIGUEROA-VILLAR, 2008).

A malária permanece como uma das principais causas de morbimortalidade no mundo. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que em 2019 quase quatro bilhões de pessoas estariam suscetíveis à malária, com registros de aproximadamente 228 milhões de casos e 405 mil mortes relacionadas a esta doença em diferentes regiões do globo. A carga global da malária está concentrada na África Subsaariana, mas a doença também é uma preocupação nas Américas, em especial no Brasil, que reporta quase metade dos casos registrados neste continente (WHO, 2020). No Brasil, em 2020, 133.837 casos autóctones de malária foram notificados somente na Amazônia brasileira; 88,9% destes eram infecções únicas por *Plasmodium vivax*, 11,1% monoinfecções por *Plasmodium falciparum* e malária mista (SOUZA *et al*., 2019; BRASIL, 2021).

O ciclo biológico da malária envolve dois hospedeiros para completar o desenvolvimento do parasito: o hospedeiro vertebrado, no qual acontece reprodução assexuada (esquizogônica), e o vetor fêmea do gênero *Anopheles* sp., em que ocorre a reprodução sexuada (esporogônica; MURGATROYD, 1952). No vertebrado, o ciclo inicia com a inoculação de formas esporozoítas do parasito na derme do hospedeiro durante o repasto sanguíneo pelo mosquito *Anopheles*. Os esporozoítos na corrente sanguínea migram e se alojam nos hepatócitos (ciclo exoeritrocitário), formando uma camada de proteção chamada vacúolo parasitóforo, sofrendo transformações e multiplicações por esquizogonia, culminando com a formação de merozoítos que são liberados na corrente sanguínea (MILLER *et al*. 2002). As espécies *P. vivax* e *Plasmodium ovale* apresentam estágios exoeritrocíticos persistentes, chamados hipnozoítos, que são estágios unicelulares que permanecem latentes por anos e são responsáveis pelas recaídas nestas duas espécies (MURGATROYD, 1952; FARID, KILPATRICK, CHIODINI, 1993).

Uma vez na corrente sanguínea, os merozoítos invadem os eritrócitos (MILLER *et al*., 2002), passam por uma série de transformações morfológicas e estruturais e se convertem em trofozoítos jovens que, por sua vez, sofrem processo de maturação, originando os esquizontes, que rompem as hemácias e liberam merozoítos, os quais invadem novas células reiniciando o ciclo celular. Após algumas gerações de merozoítos eritrocíticos, algumas formas se diferenciam em estágios sexuados, chamados de gametócitos, que não mais se dividem e são os estágios infectantes para o mosquito, dando início ao ciclo biológico no vetor, ciclo sexuado ou ainda, esporogônico (VOZA *et al*., 2012; JOSLING & LLINAS, 2015).

Os sintomas clínicos decorrentes da infecção pelas espécies do gênero *Plasmodium* ocorrem na fase eritrocítica e a maioria dos fármacos atua nesta fase, impedindo que formas de trofozoítos jovens se convertam em esquizontes (GREENWOOD *et al*., 2008). No entanto, o desenvolvimento de novos fármacos que atuem nos estágios hepáticos é crucial e urgente, em especial, para o controle da malária pelo *P. vivax*. Neste sentido, as plantas são importantes fontes de fármacos antimaláricos, principalmente, as espécies ricas em alcaloides. Ressalta-se também que as principais estratégias para redução da morbidade e mortalidade pela malária estão amparadas pela associação do diagnóstico oportuno e tratamento imediato dos casos detectados (BRASIL, 2021).

DESENVOLVIMENTO

- Descoberta dos principais antimaláricos e contribuições das plantas medicinais para o tratamento da malária

No século XVII, missionários Jesuítas descobriram que tribos indígenas sul-americanas utilizavam a casca de uma árvore para o tratamento de febres intermitentes. O princípio ativo desta árvore, o quinino, foi isolado em 1820 por Pelletier e Caventou, e manteve-se como fármaco de eleição para tratamento da malária até o século XX, quando em 1910 foram registrados os primeiros relatos de resistência a este fármaco (PELLETIER & CAVENTOU, 1820; WONGSRICHANALAI *et al*., 2002; OLIVEIRA & SZCZERBOWSKI, 2009).

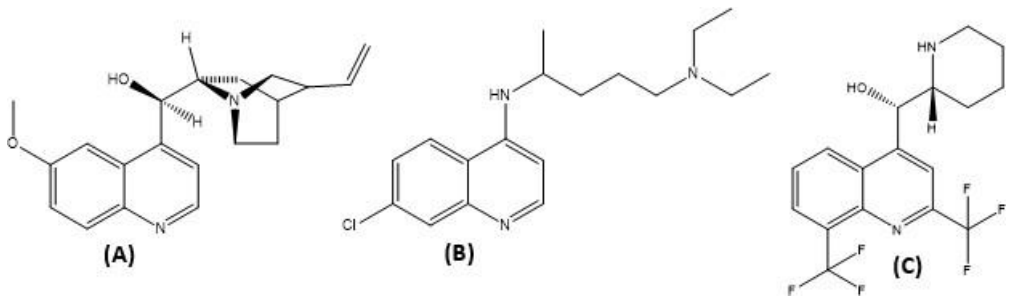
A técnica para o desenvolvimento de moléculas sintéticas baseadas na estrutura do Quinino (Figura 1A) teve início no século XIX. Em 1850, o químico August W. von Hofmann sugeriu a possibilidade de um derivado do carvão de alcatrão ser convertido em quinino. Posteriormente, verificou-se que este era rico em isoquinolina e quinolina. Estas moléculas têm estruturas básicas das quais outras moléculas podem ser formadas, por meio de sucessivas reações químicas (ALLINGER *et al*., 2017). A partir do quinino, novos fármacos antimaláricos foram desenvolvidos.

O quinino pertence à classe das quinolinas que incluem as 4-aminoquinolinas, as 8-aminoquinolinas e os álcoois quinolínicos, sendo ativos contra formas eritrocíticas de *Plasmodium* sp. Trata-se de uma base fraca que induz ao desequilíbrio no vacúolo parasitóforo ou digestivo de pH ácido do *Plasmodium* sp., assim, impedindo a formação da hemozoína ou pigmento malárico, resultando na destruição do parasito. No entanto, este fármaco possui alta toxicidade e necessita ser administrado várias vezes ao dia devido ao seu curto tempo de meia-vida (SCHLESINGER, KROGSTAD, HERWALDT, 1988; CAMARGO *et al*., 2009).

Na classe das quinolinas, tem-se também a cloroquina (Figura 1B), que foi descoberta e sintetizada na Alemanha em 1934 e, um ano depois, já começou a ser utilizada em pacientes infectados por *P. vivax* durante a Segunda Guerra Mundial. A cloroquina rapidamente ganhou popularidade por ter alta eficácia, segurança devido sua baixa toxicidade, tolerância e ser um fármaco de baixo custo para tratamento da malária por *Plasmodium* sp. (BAIRD, 2004; CAMARGO *et al*., 2009). Este fármaco tem ação esquizonticida sanguínea para as espécies *P. vivax*, *Plasmodium malariae*, *P. ovale*, *Plasmodium knowlesi* e, no caso do *P. falciparum*, somente para as cepas ainda sensíveis. É importante destacar que resistência do *P. falciparum* à cloroquina é encontrada em quase todos os países endêmicos, sobretudo, na África Oriental e somente poucos países da América Central, como Haiti e República Dominicana, ainda não relataram resistência do *P. falciparum* a esta droga (RIDLEY, 1998; HYDE, 2002; 2005; 2007; HAMRE *et al*., 2020).

Outro fármaco pertencente a mesma classe das quinolinas é a mefloquina (Figura 1C), que foi sintetizada na década de 60, destacando-se como uma droga promissora frente ao aparecimento de cepas de *P. falciparum* resistentes à cloroquina. Porém, esta estratégia foi comprometida em razão deste fármaco agir como esquizonticida sanguíneo prolongado, uma vez que a mefloquina tem uma eliminação lenta do organismo, o que pode facilitar a seleção de parasitos resistentes (FRANÇA, SANTOS, FIGUEROA-VILLAR, 2008).

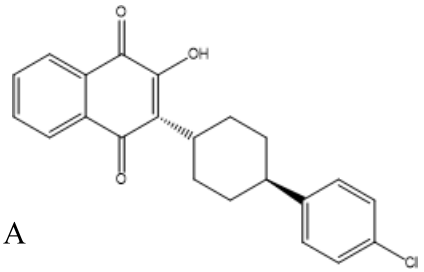
Figura 1: Estrutura química dos fármacos antimaláricos da classe das quinolinas. Legenda: A-Quinina, B-Cloroquina, C- Mefloquina.



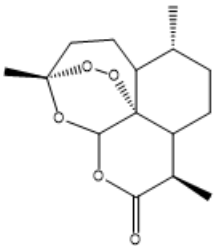
De plantas medicinais foi isolado o lapachol, uma naftoquinona, e seu análogo atovaquona (Figura 2A), que se mostrou mais potente como antimalárico e menos tóxico quando comparado aos demais análogos. O mecanismo de ação deste fármaco foi atribuído à competição pelo sítio catalítico da ubiquinona na mitocôndria do parasito, causando colapso no transporte de elétrons nesta organela, impedimento o fornecimento da dihidrooratato desidrogenase e inibindo a biossíntese de purinas (NIXON *et al*., 2013). Ainda nos anos 60 (séc. XX), a República Popular da China realizou um programa sistemático de estudo das plantas medicinais visando a busca de novos fármacos (KLAYMAN, 1985). *Artemisia annua* L. tinha uma longa história de uso para o tratamento de hemorroidas e como antifebril (MESHNICK, TAYLOR, KAMCHONWONGPAISAN, 1996). Em 1978, a decocção de *A. annua e Carapax trionycis* foi usada para tratamento da malária e, em 1971, foi demonstrado que o extrato etéreo de *A. annua* apresentava atividade antimalárica. No ano seguinte foi isolado o princípio ativo, denominado qinghaosu e esta substância ficou conhecida no Ocidente como artemisinina (Figura 2B; KLAYMAN, 1985).

O isolamento de derivados da artemisinina mudou o foco da pesquisa para moléculas baseadas na estrutura química desta substância. A artemisinina é uma lactona sesquiterpênica (QIGUI, MILHOUS, WEINA, 2007), que possui uma ligação endoperóxido, e os derivados mais comuns são a diidroartemisinina, arteméter (Figura 2C), artemisiteno e artesunato de sódio (Figura 2D; LUO & SHEN, 1987; BALINT, 2001).

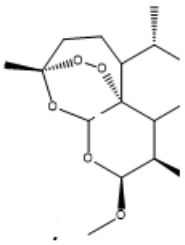
Figura 2: Estrutura química dos fármacos atovaquona, artemisinina e derivados. Legenda: A- Atovaquona, B- Artemisinina, C- Artemeter, D- Artesunato.



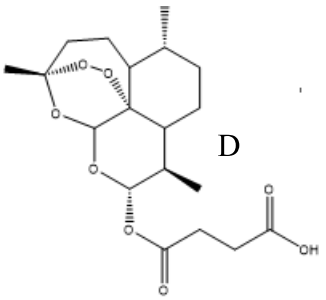
A



B



C



D

Como relatado anteriormente, dois dos principais fármacos utilizados no tratamento da malária, quinino e artemisina, foram isolados de espécies vegetais que já tinham tradição milenar pelo uso popular. Portanto, a busca por moléculas oriundas de produtos naturais para combater a malária constitui importante estratégia, sobretudo, frente à emergência e propagação de cepas de plasmódios resistentes aos antimaláricos disponíveis. Pois, em razão da diversidade estrutural, os elementos extraídos de plantas podem ser sintetizados para formar novos compostos que, por sua vez, podem ampliar as opções terapêuticas para o tratamento efetivo da malária (DOLABELA, 2007; GOMES, 2010; DOLABELA *et al*., 2015).

Ressalta-se ainda que o caminho para uma substância de origem vegetal se tornar efetivamente um fármaco com atividade antimalárica comprovada, compreende o seguimento de alguns critérios de seleção, como: 1- a substância selecionada deve demonstrar atividade antimalárica tanto em cepas de *P. falciparum* resistentes como nas sensíveis à cloroquina, 2- esta mesma substância deve ser seletivamente tóxica aos plasmódios, 3- a substância deve ser capaz de destruir e eliminar os parasitos da malária em camundongos, mas sem apresentar toxicidade, e 4- a substância deve apresentar atividade farmacológica também pela via de administração oral (WRIGHT, 2005).

- Resistência dos plasmódios aos antimaláricos e a necessidade de buscar novos fármacos

A resistência dos plasmódios aos antimaláricos é um dos maiores desafios ao controle da malária, além dificultar os esforços globais para eliminar a doença. O monitoramento da prevalência de parasitos resistentes a um fármaco é elemento crucial para as estratégias de controle e eliminação, pois este conhecimento dará subsídios técnicos para a escolha e aplicação do protocolo terapêutico apropriado. O fenômeno da resistência se deve ao princípio da evolução das espécies, em que a pressão dos fármacos desempenha função essencial no processo de seleção natural dos parasitos resistentes dentro do hospedeiro (HASTINGS & DONNELLY, 2005).

A resistência *in vivo* foi classicamente definida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como “capacidade que uma dada população de parasitos tem para se multiplicar ou sobreviver, na presença de concentrações de fármaco que, habitualmente, destruiriam os parasitos da mesma espécie ou impediriam a sua multiplicação” (WHO, 1973). Portanto, para a confirmação da resistência do *Plasmodium* sp. a um antimalárico é necessário evidenciar que os parasitos são recrudescentes em um indivíduo que, comprovadamente, fez uso de tratamento antimalárico e que a concentração sanguínea eficaz do fármaco ou de seus metabólitos biologicamente ativos foi mantida por, ao menos, quatro ciclos parasitários (NSANZABANA *et al*., 2018).

A multirresistência a antimaláricos faz referência ao fenótipo de resistência a dois ou mais fármacos, fato que tem sido observado, principalmente em *P. falciparum*. Este fenótipo pode acontecer em simultâneo ou como resultado de resistência cruzada. A resistência a vários antimaláricos em simultâneo resulta da utilização frequente e simultânea dos mesmos, causando uma pressão seletiva que culmina no aparecimento de multirresistência. Já a resistência cruzada entre antimaláricos está relacionada aos aspectos comuns de seus mecanismos de ação (fatores farmacodinâmicos), bem como aos mecanismos de resistência que estão correlacionados (LE BRAS & DURAND, 2003).

A longo prazo, o uso de diferentes fármacos também leva ao surgimento de cepas de parasitos multirresistentes. Por outro lado, a adoção de esquemas de associação ou combinação de fármacos que atuam em alvos diferentes no parasito diminui a probabilidade do surgimento de cepas resistentes (TARGETT *et al*., 2001; NOSTEN & BRASSEUR, 2002).

Devido à limitação de ensaios *in vitro* e à escassez de marcadores moleculares confiáveis para *P. vivax*, a falha terapêutica é constantemente adotada como alternativa à análise de resistência emergente desta espécie aos antimaláricos. Contudo, ressalta-se que resistência e falha terapêutica são fenômenos distintos. Falha terapêutica representa ausência da resolução de manifestações clínicas após tratamento com um determinado fármaco, podendo ser influenciada pela dosagem incorreta, não adesão do indivíduo ao tratamento (posologia,duração do tratamento, etc.), qualidade do fármaco, interações farmacológicas, variações interindividuais na farmacocinética do medicamento (exemplo: baixa absorção ou rápida eliminação) e insuficiente ou fraca biotransformação das pró-drogas devido às características farmacogenéticas. Quanto à resistência, é um fenômeno de maior complexidade que falha terapêutica, no qual o surgimento é influenciado por fatores relacionados ao parasito, hospedeiro, vetor e fármaco (WHO, 2020; 2021).

A resistência do *P. falciparum* à cloroquina surgiu de forma independente no final da década de 50 na Colômbia e no Brasil bem como na região de fronteira Tailândia-Camboja e se expandiu para a África no final dos anos 70 (ROSÁRIO, 1976; ZALIS, 2000; WHITE, 2004; GREENWOOD *et al*., 2008; CAMPBELL, 2009). A resistência do *P. vivax* à cloroquina só foi registrada pela primeira vez décadas depois, em amostras provenientes de dois soldados australianos que viajaram para Papua Nova Guiné (RIECKMANN, DAVIS, HUTTON, 1989). No restante das áreas endêmicas com circulação do *P. vivax*, a cloroquina permanece eficaz como esquizonticida sanguíneo. Porém, a resistência está evoluindo e já foi detectada no Sul e Sudeste Asiático, Oriente Médio, África Oriental e Américas (PRICE *et al*., 2014; GONÇALVES, CRAVO, FERREIRA, 2014; CHU & WHITE, 2016). Ressalta-se que a região peninsular do sul da Ásia é responsável pela maior parte da carga global da malária por *P. vivax*

(BATTLE *et al*., 2019), contudo a resistência do *P. vivax* à cloroquina permanece incomum (PRICE *et al*., 2014; CHU & WHITE, 2016; FERREIRA *et al*., 2021).

Observações de diminuição da suscetibilidade dos plasmódios ao quinino e mefloquina têm sido evidenciadas, em especial, na área de fronteira Tailândia-Camboja, região considerada de resistência a multidrogas. Nesta área, a mefloquina já apresenta falha clínica de mais de 50% e o quinino redução da sensibilidade. É importante citar que a distribuição espacial dos casos esporádicos de falhas terapêuticas a estas drogas do grupo das quinolinas, quer sejam utilizados para fins de profilaxia em viajantes como para tratamento, abrange áreas na Ásia, África e América do Sul (SU & WOOTTON, 2004; HYDE, 2007; CHAIJAROENKUL, WISEDPANICHKIJ, NA-BANGCHANG**,** 2010; FERREIRA *et al*., 2021).

A terapia combinada com base em artemisinina e seus derivados é defendida como a melhor opção de tratamento para controlar a rápida emergência da resistência dos plasmódios às drogas antimaláricas. Entretanto, a primeira evidência publicada de resistência do *P. falciparum* ao tratamento com a artemisinina foi observada em Ruanda no ano de 2020. E, apesar do aparecimento e detecção destas cepas mutantes, o tratamento à base de artemisinina e seus derivados permanece com eficácia acima de 90% nas diversas áreas endêmicas para malária ao redor do mundo (UWIMANA *et al*., 2020; FERREIRA *et al*., 2021).

No que concerne à espécie *P. vivax*, a resistência à artemisinina e seus derivados ainda não foi descrita. Quanto à resistência desta espécie à cloroquina no Brasil, os primeiros relatos foram divulgados na década de 90 no município de Manaus (ALECRIM, ALECRIM, MACEDO, 1999; ALECRIM *et al*., 1999). E nesta mesma região, outras investigações também relataram taxa de até 10% de falha terapêutica (CHEHUAN *et al*., 2013; MARQUES *et al*., 2014).

Em relação à primaquina, tolerância ou resistência do *P. vivax* a esta droga permanece incerta. Pois, diante de doses fixas deste fármaco, indivíduos com sobrepeso podem estar sujeitos à subdosagem, e este evento pode ser equivocadamente atribuído à resistência do *P. vivax* à primaquina. Ademais, há evidências científicas que demonstram que o processo de conversão da primaquina nos metabólitos bioativos depende do citocromo P450 do fígado, mais precisamente da isoforma CYP2D6. Sendo assim, indivíduos classificados como metabolizadores lentos ou intermediários podem manifestar menor atividade terapêutica com consequente aumento do risco de recaída, em razão de uma base farmacocinética e não necessariamente em função de resistência. Portanto, é essencial que os estudos sobre eficácia clínico-terapêutica da primaquina incluam avaliações farmacogenéticas e/ou fenotípicas concomitantes para amparar qualquer análise científica relacionada à possível resistência à primaquina (CHU & WHITE, 2016; COSTA *et al*., 2017; FERREIRA *et al*., 2021).

Diante desse panorama, devem-se priorizar as seguintes ações: 1- monitoramento da eficácia clínico-terapêutica aos antimaláricos, 2- monitoramento da prevalência de parasitos resistentes a estes fármacos, 3- vigilância genômica do fenômeno da resistência, e 4- desenvolvimento de novos medicamentos (MENARD & DONDORP, 2017; FERREIRA *et al*., 2021).

- As plantas medicinais amazônicas e alguns estudos para análise da atividade antimalárica

A utilização de plantas medicinais para o tratamento de doenças febris, entre elas a malária, é prática comum pela população Amazônica. Alguns estudos realizados na Amazônia demonstraram que diferentes espécies, pertencentes a diferentes famílias vegetais são utilizadas com estes objetivos terapêuticos (COSTA, 2013).

Entre os povos amazônidas, o conhecimento tradicional dos povos indígenas possui uma grande importância. Ressalta-se que na corrida da colonização da região, sem dúvidas nenhuma, os povos indígenas foram os mais vitimados pelas epidemias, dentre estas, a malária merece um destaque especial. O problema foi agravado pelo desenvolvimento de cepas da espécie *P. falciparum* resistentes à cloroquina. Estudo realizado com a comunidade indígena Yanomami no estado de Roraima levou a coleta de mais de 90 espécies vegetais, muitas das quais já haviam sido citadas para o uso no tratamento de malária e febres em outros lugares. Descobriu-se que o conhecimento sobre plantas com atividade antimalárica varia muito entre as comunidades e, em alguns casos, há evidências de experimentação recente. A triagem inicial dos extratos de plantas mostrou ainda uma alta incidência de atividade antimalárica entre as espécies coletadas (MILLIKEN, 1997).

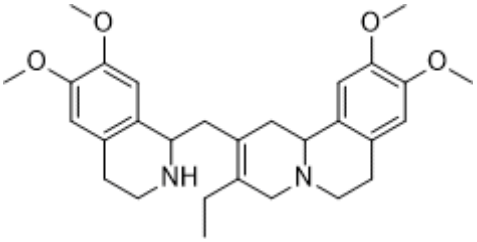
Estudo realizado na década de 80 em área da Amazônia, onde se substituiu a abordagem empírica de testagem das plantas medicinais pela triagem baseada na informação de uso tradicional, observou que outras espécies vegetais, muitas não incluídas no grupo de "famílias reconhecidas como febrífugas", parecem ser promissoras como substâncias ativas com atividade antimalárica (BRANDÃO, BOTELHO, KRETTLI, 1985).

Estudo etnobotânico realizado no estado do Amapá determinou que 16 espécies são utilizadas para tratamento da malária. Uma das espécies, a *Amasonia campestres*, foi avaliada quanto à sua atividade *in vitro* (*P. falciparum*) e *in vivo* (*P. berghei*), onde observou-se elevada redução da parasitemia e moderada atividade antiplasmódica (COSTA, 2013). Outro estudo realizado em comunidade ribeirinha no baixo rio Negro, estado do Amazonas, identificou 62 espécies vegetais de 53 gêneros e 34 famílias botânicas diferentes utilizadas no tratamento da

malária, enquanto 25,8% destas foram citadas pela primeira vez em estudos etnobotânicos realizados na América Latina para tratamento da doença (VEIGA & SCUDELLER, 2014).

Em relação às plantas medicinais promissoras como princípios ativos com ação antimalárica, muitas possuem como composto ativo alcaloides, sendo frequente a comprovação da atividade antimalárica de espécies pertencentes às famílias Apocyanceae e Rubiaceae (DOLABELA *et al*., 2015; BRANDÃO *et al*. 2020). Classicamente, os alcaloides relacionados à atividade antimalárica e à investigação fitoquímica da família Rubiaceae revelam que os alcaloides indólicos são seus marcadores químicos (WENKERT *et al*., 1976), com destaque aos isoquinolínicos e quinolínicos e diversas espécies são descritas com potencialantimalárico, como a *Cinchona ledgeriana* (CORDELL, QUINN-BEATTIE, FARNSWORTH, 2001), *Keetia leucantha* (BERO *et al*., 2009) e *Morinda moridoides* (ZIRIHI *et al*., 2005). Os alcaloides encontrados nas espécies desta família demonstram efeitos farmacológicos como antiagregante plaquetário, citotóxico, analgésico, antimalárico e antileishmania (FORMAGIO *et al*., 2014). Nesta família, uma espécie merece uma atenção especial, a *Carapichea ipecacuanha* (Brot.) L. Andersson**.** A *C. ipecacuanha*, também conhecida como ipeca- verdadeira, poaia, poaia cinzenta, dentre outras sinonímias, é nativa das regiões sombrias e úmidas. Possui grande prevalência em regiões de florestas tropicais das Américas, comocorrência na América Central, Colômbia, Venezuela, Peru, Equador, Bolívia, Guiana e Brasil,onde desde a década de 90 vem sendo utilizada pela população Amazônica no tratamento da malária (MILLIKEM, 1997). Nas raízes da *C. ipecacuanha* são encontrados: amido, açúcares,resinas, tanino, ácido málico, ácido cítrico, ácido ipecacuanhico e os alcaloides, que estão relacionados às propriedades terapêuticas da planta (BOTERO, URREA, NARANJO, 2015), sendo o principal metabólito secundário, predominando emetina, cefalina e psicotrina. A emetina é o principal princípio ativo presente nas raízes da *C. ipecacuanha* e pode ser produzidasinteticamente a partir da metilação da cefalina, sendo a dihidroemetina seu análogo sintético, distinta em apenas uma ligação dupla ao lado do substituinte etil (Figura 3), que confere à forma sintética menor efeito colateral (SILVA, 2014).

Figura 3: Estrutura química da dihidroemetina.



Estudo envolvendo 13 populações de ipecas oriundas dos estados do RJ, BA, MG e ES, demonstrou que mais de 80% das amostras apresentaram teor de emetina superior a 1%, já os teores de cefalina em 39% das amostras analisadas foram superiores a 0,3% (MARTINS *et al*., 2009).

O efeito do cloridrato de emetina foi avaliado em hamsters infectados com *Leishmania* (Viana) *brasiliensis* submetidos ao tratamento com 03 doses intralesão (IL) de 1 mg/Kg do alcaloide com ciclos de três semanas de repouso entre doses. Comparados ao tratamento convencional com Glucantime®, ambos os tratamentos reduziram o tamanho médio das lesões (CARZOLA *et al*., 2001). O hidrato dicloridrato de emetina associado ou não à dihidroartemisinina foi submetido à avaliação da atividade antimalárica utilizando clone de *P. falciparum* (K1) multirresistente. A emetina demonstrou ser um potente inibidor do parasito, com CI_{50} ~ 47nM, estando associado ou não a dihidroartemisinina (MATTHEWS *et al*. 2013).

Conforme relatado, a emetina é um dos alcaloides presentes na *C. ipecacuanha* e apesar de seu uso popular na medicina tradicional no tratamento da malária e da atividade antimalárica de seu alcaloide majoritário, há escassez de estudos para avaliação da atividade antimalárica de seu extrato, frações e outros alcaloides até o momento (DUARTE, 2006).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante do panorama exposto associado à disseminação da resistência do *P. falciparum* aos fármacos antimaláricos disponíveis, é urgente a busca por alternativas terapêuticas para mitigar os desafios apresentados. Neste sentido, as plantas medicinais sempre deram importantes contribuições para promoção da saúde da população. Além disto, os elementos isolados a partir dos extratos vegetais representam uma importante fonte para a geração de protótipos candidatos a novos fármacos com atividade antimalárica, uma vez que agregam vários elementos estratégicos, como: 1- ampliação dos recursos terapêuticos, 2- conservação dos conhecimentos, práticas e saberes populares, 3- preservação da biodiversidade e educação ambiental, e 4- colaboração para o desenvolvimento socioeconômico da população.

Entretanto, muitas espécies vegetais utilizadas popularmente para o tratamento de doenças febris, entre elas a malária, ainda carecem de estudos e, neste aspecto, importantes entidades terapêuticas podem estar sendo perdidas. Por conseguinte, urge a ampliação das pesquisas sobre o desenvolvimento técnico e tecnológico de fármacos de origem vegetal, particularmente, para a produção de novos princípios ativos a partir de arquétipos ou moléculas vegetais oriundos da flora encontrada no bioma brasileiro, em especial, da região Amazônica.

REFERÊNCIAS

1. ALECRIM, M. D. G. C.; ALECRIM, W. D.; MACEDO, V. *Plasmodium vivax* resistance to chloroquine (R2) and mefloquine (R3) in Brazilian Amazon region. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 32, p. 67–68, 1999.
2. ALECRIM, M. D. G. C.; ALECRIM, W. D.; MACÊDO, V.; KORVES, C. T.; ROBERTS, D. R.; LI, J.; SULLIVAN, M.; MCCUTCHAN, T. F. Description of a possible clonal expansion of*Plasmodium vivax* in Manaus - Amazonas – Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 32, p. 303–305, 1999.
3. ALLINGER, N. L.; CAVA, M. P.; JONGH. D. C.; JOHNSON, C. R.; LEBEL, N. A.; STEVENS, C. L. In: **Química Orgânica**. 2ª ed. São Paulo: LTC. 2017.
4. BAIRD, J. K. Chloroquine resistance in *Plasmodium vivax*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 11, p. 4075-4083, 2004.
5. BALINT, G. A. Artemisinin and its derivatives. An important new class of antimalarial agents. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 90, n. 2-3, p. 261- 265, 2001.
6. BATTLE, K. E.; LUCAS, T. C. D.; NGUYEN, M.; HOWES, R. E.; NANDI, A. K.; TWOHIG, K. A., *et al*. Mapping the global endemicity and clinical burden of *Plasmodium vivax*, 2000-17:a spatial and temporal modelling study. **The Lancet**, v. 394, p. 332–343, 2019.
7. BERO, J.; GANFON, H.; JONVILLE, M. C.; FREDERICH, M.; GBAGUIDI, F. *In vitro* antiplasmodial activity of plants used in Benin traditional medicine to treatmalaria. **Journal of Ethnophamacology**, v. 133, n. 3, p. 439-444. 2009.
8. BOTERO, C.; URREA, A.; NARANJO, E. Potencial de regeneración de *Psychotria ipecacuanha* (*Rubiaceae*) a partir de capas delgadas de células. **Acta Biológica Colombiana**, v. 20, n. 3, p.181-192, 2015.
9. BRANDÃO, D. L. N.; MARTINS, M. T.; SILVA, A. O.; ALMEIDA, A. D.; PAULA, R. C.; OLIVEIRA, A. B.; COELHO-FERREIRA, M. R.; GOMES, A. T. A.; VASCONCELOS, F.; PEREIRA, W. L. A.; VALE, V. V.; PERCÁRIO, S.; DOLABELA, M. F. Anti-malarial activityand toxicity of Aspidosperma nitidum Benth: a plant used in traditional medicine in the Brazilian Amazon. **Research, Society and Development**, v. 9, p.e 5059108817, 2020.
10. BRANDÃO, M. G. L.; BOTELHO, M. G. A.; KRETTLI, A. U. Quimioterapia experimental antimalárica com produtos naturais: Uma abordagem mais racional? **Ciência e Cultura**, v. 37,n. 7, p. 1152–63, 1985.
11. BRASIL. **Boletim Epidemiológico**. 2021. Disponível em: <http://200.214.130.44/sivep_malaria/>. Acesso em 15 de maio de 2021.
12. BRUCE-CHWATT, L. J. Historical outline. In: **Essential Malariology.** London: William Heinemann, 1980. p. 1-9.
13. BRUCE-CHWATT, L. J. History of malaria from prehistory to eradication. In: **Malaria: Principles and Practice of Malariology.** McGregor, I. A. (ed.). Churchill Livingstone, Edinburg, London, Melbourne and New York, 1988. p. 1-60.
14. CAMARGO, L. M.; OLIVEIRA, S.; BASANO, S.; GARCIA, C. R. S. Antimalarials and the fight against malaria in Brazil. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v. 5, p. 311– 317, 2009.
15. CAMPBELL, C. C. Malaria Control — Addressing Challenges to Ambitious Goals. **The New England Journal of Medicine**, v. 361, n. 5, p. 522-523, 2009.
16. CARZOLA, D.; YÉPEZ, J.; AÑEZ, N.; MIRT, A. S. de. Efecto del tratamiento intralesional com clorhidrato de emetina sobre *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*. **Investigación Clinica**, v. 42, n. 1, p. 5-21, 2001.
17. CHAIJAROENKUL, W.; WISEDPANICHKIJ, R.; NA-BANGCHANG, K. Monitoring of *in vitro* susceptibilities and molecular markers of resistance of *Plasmodium falciparum* isolates from Thai-Myanmar border to chloroquine, quinine, mefloquine and artesunate. **Acta Tropica,**v. 113, n.2, p. 190-194, 2010.

18. CHEHUAN, Y.F.; COSTA, M.R.F.; COSTA, J.S.; ALECRIM, M.G.C.; NOGUEIRA, F.; SILVEIRA, H.; BRASIL, L.W.; MELO, G.C.; MONTEIRO, W.M.; LACERDA, M.V.G. In vitro chloroquine resistance for *Plasmodium vivax* isolates from the Western Brazilian Amazon.**Malaria Journal**, 12, n. 226, 2013.
19. CHU, C.S.; WHITE, N.J. Management of relapsing *Plasmodium vivax* malaria. **Expert Review of Anti-infective Therapy,** v. 14, n. 10, p. 885–900. 2016.
20. CORDELL, G. A.; QUINN-BEATTIE, M. L.; FARNSWORTH, N. R. The potencial ofalkaloids in drug discovery. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 3, p. 183-205. 2001.
21. COSTA, E. V. M. da. **Estudo etnobotânico sobre plantas utilizadas como antimaláricas noestado do amapá, avaliação da atividade antimalárica e toxicidade aguda por via oral de *Amasonia campestris* (Aubl.) Moldenke. Macapá.** 2013. 142 f. Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical – PPGBIO.
22. COSTA, G. L., AMARAL, L. C., FONTES, C. J. F., CARVALHO, L. H., DE BRITO, C.F.A.,DE SOUSA, T. N. Assessment of copy number variation in genes related to drug resistance in *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* isolates from the Brazilian Amazon and a systematic review of the literature. **Malaria Journal**, v. 16, n. 152, p. 1-11, 2017.
23. DOLABELA, M. F. **Atividade antiplasmódica e citotoxicidade de *E. febrífuga* (A. St. Hill.) Juss. Ex. Mart. (Rutaceae) e espécies de Aspidosperma Mart. (Apocynaceae).** 154f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.
24. DOLABELA, M. F.; PÓVOA, M. M.; BRANDÃO, G. C.; ROCHA, F. D.; SOARES, L. F.; PAULA, R. C. de; OLIVEIRA, A. B. de. Aspidosperma species as sources of anti-malarials: uleine is the major anti-malarial indole alkaloid from *Aspidosperma parvifolium* (*Apocynaceae*).**Malaria Journal**, v.14, p. 498-510, 2015.
25. DUARTE, M. C. T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **Revista MultiCiência**, n. 7, 2006.
26. FARID, Z.; KILPATRICK, M. E.; CHIODINI, P. L. Parasitic Diseases of the Liver. In: **Diseases of the Liver.** Schiff, L. & Schiff, E. R. (eds.). Philadelphia, Lipincott Company, 1993. p. 1338-1355.
27. FERREIRA, M. U.; SOUSA, T. N.; RANGEL, G. W.; JOHANSEN, I. C.; CORDER, R. M.; LADEIA-ANDRADE, S.; GIL, J. P. Monitoring *Plasmodium vivax* resistance to antimalarials: Persisting challenges and future directions. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance,** v.15, p. 9–24, 2021.
28. FORATTINI, O. P. In: **Culicidologia Médica**, v. 2: Identificação, Biologia, Epidemiologia. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, p. 54 – 62, 292 e 321, 2002.
29. FORMAGIO, A. S. N.; VOLOBUFF, C. R. F.; SANTIAGO, M.; CARDOSO, C. A. L.; VIEIRA, M. do C.; PEREIRA, Z. V. Evaluation of antioxidant activity, total flavonoids, tannins and phenolic compounds in *Psychotria* leaf extracts. **Antioxidants**, v. 3, n. 4, p. 745-57. 2014.
30. FRANÇA, T. C. C.; SANTOS, M. G.; FIGUEROA-VILLAR, J. D. Malária: Aspectos Históricos e Quimioterapia. **Química Nova**. v. 31, n. 5, p. 1271-1275, 2008.
31. GOMES, E. T. Etnobotânica e Etnofarmacologia. In: **Farmacognosia e Fitoquímica**. Parte I. 3. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, p. 38-39, 2010.
32. GONÇALVES, L. A.; CRAVO, P.; FERREIRA, M. U. Emerging *Plasmodium vivax* resistance to chloroquine in South America: an overview. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, p. 534–539, 2014.
33. GREENWOOD, B.M.; FIDOCK, D.A.; KYLE, D.E.; KAPPE, S.H.I.; ALONSO, P.L.; COLLINS, F.H.; DUFFY, P.E. Malaria: progress, perils, and prospects for eradication. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 4, p. 1266-1276, 2008.

34. HAMRE, K. E. S.; PIERRE, B.; NAMUYINGA, R.; MACE, K.; ROGIER, E. W.; UDHAYAKUMAR, V.; BONCY, J.; LEMOINE, J. F.; CHANG, M. A. Establishing a National Molecular Surveillance Program for the Detection of *Plasmodium falciparum* Markers of Resistance to Antimalarial Drugs in Haiti. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 103, n. 6, p. 2217-2223, 2020.
35. HASTINGS, I. A.; DONNELLY, M. J. The impact of antimalarial drug resistance mutations onparasite fitness, and its implications for the evolution of resistance. **Drug Resistance Updates**,v. 8, n. 43, p. 43-50, 2005.
36. HYDE, J. E. Mechanisms of resistance of *Plasmodium falciparum* to antimalarial drugs. **Microbes and Infection**, v. 4, p. 165-174, 2002.
37. HYDE, J. E. Drug-resistant malaria. **Trends in Parasitoloy**, v. 21, n 11, p. 494–498, 2005.
38. HYDE, J. E. Drug-resistant malaria - an insight. **FEBS Journal**, v. 274, n. 18, p. 4688–4698, 2007.
39. JOSLING, G. A.; LLINAS, M. Sexual development in *Plasmodium* parasites: knowing whenit's time to commit. **Nat Rev Microbiol**., v. 13, n. 9, p. 573-87, 2015.
40. KLAYMAN, D. L. Qinqhaosu (Artemisinin): an antimalarial drug from China. **Science**, v. 228,p. 1049-1055, 1985.
41. LE BRAS, J.; DURAND, R. The mechanisms of resistance to antimalarial drugs in *Plasmodiumfalciparum*. **Fundamental and Clinical Pharmacology**, v. 17, n. 2, p. 147-153, 2003.
42. LUO, X. D.; SHEN, C. C. The Chemistry, Pharmacology, and Clinical Applications of Qinghaosu (Artemisinin) and Its derivatives. **Med. Res. Rev.**, v. 7, p. 29-52, 1987.
43. MARQUES, M. M.; COSTA, M. R. F.; SANTANA FILHO, F. S.; VIEIRA, J. L. F.; NASCIMENTO, M. T. S.; BRASIL, L. W.; NOGUEIRA, F.; SILVEIRA, H.; REYES-LECCA, R. C.; MONTEIRO, W. M.; LACERDA, M. V. G.; ALECRIM, M. G. C. *Plasmodium vivax* Chloroquine Resistance and Anemia in the Western Brazilian Amazon. **Antimicrobial Agentsand Chemotherapy**, 58, p. 342–347, 2014.
44. MARTINS, E. R.; OLIVEIRA, L. O.; MAIA, J. T. L. S.; VIEIRA, I. J. C. Estudo ecogeográficoda poaia [*Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes]. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**,v. 11, n. 1, p. 24-32, 2009.
45. MATTHEWS, H.; USMAN-IDRIS, M.; KHAN, F.; READ, M.; NIRMALAN, N. Drug repositioning as a route to anti-malarial drug discovery: preliminary investigation of the *in vitro* anti-malarial efficacy of emetine dihydrochloride hydrate. **Malaria Journal**. v. 12, p.359, 2013.
46. MENARD, D.; DONDORP, A. Antimalarial Drug Resistance: A Threat to Malaria Elimination. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 7, pe: a025619, 2017.
47. MESHNICK, S. R.; TAYLOR, T. E.; KAMCHONWONGPAISAN, S. Artemisinin and the Antimalarial Endoperoxides; from Herbal Remedy to Targeted Chemotherapy. **Clinical Microbiology Review**, v. 60, p. 301-315, 1996.
48. MILLER, L. H.; BARUCH, D. I.; MARSH, K.; DOUMBO, O. K. The pathogenic basis ofmalaria. **Nature,** v. 475, p. 673-679, 2002.
49. MILLIKEN, W. Plants for malaria, plants for fever. Medicinal species in Latin America – a bibliographic survey. **Royal Botanic Gardens Kew**. 1997.
50. MURGATROYD, F. The chemotherapy of malaria. **Postgraduate Medical Journal,** v. 28, p.5-10, 1952.
51. NIXON, G.L.; MOSS, D.M.; SHONE, A.E.; LALLOO, D.G.; FISHER, N.; O'NEILL, P.M.; WARD, S.A.; BIAGINI, G.A. Antimalarial pharmacology and therapeutics of atovaquone. **Journal of Antimicrobiology Chemotherapy**, v. 4, p. 1-9, 2013.
52. NOSTEN, F.; BRASSEUR, P. Combination therapy for malaria. **Drugs**, v. 62, n. 9, p. 1315-29,2002.

53. NSANZABANA, C.; DJALLE, D.; GUÉRIN, P. J.; MÉNARD, D.; GONZÁLEZ, I. J. Tools for surveillance of anti-malarial drug resistance: an assessment of the current landscape. **Malaria Journal**, v. 17, n.75, p. 1-16, 2018.
54. OLIVEIRA, A. R. M. de; SZCZERBOWSKI, D. Quinina: 470 anos de história, controvérsias e desenvolvimento. **Química Nova**, v.32, n.7, p. 1971-1974, 2009.
55. PELLETIER, P. J.; CAVENTOU, J. B. **Annales de Chimie et de Physique**. 1820, XV, 289.
56. PRICE, R. N.; VON SEIDLEIN, L.; VALECHA, N.; NOSTEN, F.; BAIRD, J. K.; WHITE, N. J. Global extent of chloroquine-resistant *Plasmodium vivax*: a systematic review and metaanalysis. **Lancet Infectious Diseases,** n.14, p. 982–991. 2014.
57. QIGUI, L.; MILHOUS, W. K.; WEINA, P. J. **Artemisinins in malaria therapy.** New York: Nova Science Publishers. 2007.
58. RIDLEY, R.G. Malaria: dissecting chloroquine resistance. **Current Biology**, v. 8, n. 10, p. 346-349, 1998.
59. RIECKMANN, K. H.; DAVIS, D. R.; HUTTON, D. C. *Plasmodium vivax* resistance to chloroquine? **Lancet**, v. 2, n. 8673, p. 1183–1184, 1989.
60. ROSÁRIO, V.E. Genetics of chloroquine resistance in malaria parasites. **Nature,** v. 261, p. 585-586, 1976.
61. SCHLESINGER, P. H.; KROGSTAD, D. J.; HERWALDT, B. L. Antimalarial agents: mechanisms of action. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 32, n. 6, p. 793-798, 1988.
62. SILVA, M. L. da. **Cultivo agroflorestal de *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes no território do baixo sul da Bahia**. 2014. 75 f. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Recursos Genéticos Vegetais). Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2014.
63. SOUZA, P. F.; XAVIER, D. R.; MUTIS, M. C. S.; MOTA, J. C. da; PEITER, P. C.; MATOS, V. P. de; MAGALHÃES, M. de A. F. M.; BARCELLOS, C. Spatial spread of malaria and economic frontier expansion in the Brazilian Amazon. **Plos One**, v. 14, n. 6, p. e0217615, 2019.
64. SU, X.; WOOTTON, J. C. Genetic mapping in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Molecular Microbiology**, v. 53, n. 6, p. 1573–1582, 2004.
65. TARGETT, G.; DRAKELEY, C.; JAWARA, M.; VON SEIDLEIN, L.; COLEMAN, R.; DEEN, J.; PINDER, M.; DOHERTY, T.; SUTHERLAND, C.; WALRAVEN, G., MILLIGAN, P. Artesunate reduces but does not prevent posttreatment transmission of *Plasmodium falciparum* to *Anopheles gambiae*. **Journal of Infectious Diseases**, v. 183, n. 8, p. 1254-9, 2001.
66. UWIMANA, A.; LEGRAND, E.; STOKES, B. H.; NDIKUMANA, J-L. M.; WARSAME, M.;UMULISA, N.; *et al*. Emergence and clonal expansion of *in vitro* artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* kelch13 R561H mutant parasites in Rwanda. **Nature Medicine**, v. 26,p. 1602–1608, 2020.
67. VEIGA, J. B.; SCUDELLER, V. V. Etnobotânica e medicina popular no tratamento de malária e males associados na comunidade ribeirinha Julião – baixo Rio Negro (Amazônia Central). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 17, n. 4, p. 737-747. 2014.
68. VOZA, T.; MILLER, J.; KAPPE, S. H. I.; SINNISA, P. Extrahepatic Exoerythrocytic Forms of Rodent Malaria Parasites at the Site of Inoculation: Clearance after Immunization, Susceptibility to Primaquine, and Contribution to Blood-Stage Infection. **Infection and Immunity**, v. 80, n. 6, p. 2158–2164, 2012.
69. WENKERT, E.; CHANG, C.; CHAWLA, H. P. S.; COCHRAN, D. W.; HAGAMAN, E. W.; KING, J. C.; ORITO, K. General methods of synthesis of indole alkaloids. 14. Short routes of construction of yohimboid and ajmalicinoid alkaloid systems and their

carbon-13 nuclear magnetic resonance spectral analysis. **Journal of the American Chemical Society**, v. 98, n. 12, p. 3645-55, 1976.

70. WHITE, N.J. Antimalarial drug resistance. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 113, n. 4, p. 1084-1092, 2004.
71. WONGSRICHANALAI, C.; PICKARD, A.L.; WERNSDORFER, W.H.; MESHNICK, S.R. Epidemiology of drug-resistant malaria. **Lancet Infectious Diseases**, v. 2, n. 4, p. 209-218, 2002.
72. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Chemotherapy of Malaria and Resistance to Antimalarials. Report of a WHO scientific group. **WHO Technical Report Series, 529.** Geneva: WHO. 1973.
73. _____. **World Malaria Report 2020**. Geneva: World Health Organization; 2020. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
74. _____. **WHO Guidelines for malaria**. Geneva: World Health Organization; 2021. Licence:CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
75. WRIGHT, C. W. Tradicional antimalarial and development of novel antimalarial drugs. **Journal of Ethnopharmacology**, 100, p. 67-71, 2005.
76. ZALIS, M. Malaria drug resistance. **Ciência e Cultura: Journal of the Brazilian Associationfor the Advancement of Science,** v. 52, p. 213-219, 2000.
77. ZIRIHI, G. N.; MAMBU, L.; GUEDE-GUINA, F.; BODO, B.; GRELLIER, P. *in vitro* antiplasmodial activity and cytotoxicity of 33 West African plants used for treatment of malaria.**Journal of Ethnopharmacology**, v. 98, p. 281-285. 2005.

CAPÍTULO III

Artigo a ser submetido à Revista "Química Nova"

INFLUÊNCIA DA PLUVIOSIDADE E DA FENOLOGIA NAS CONCENTRAÇÕES DE EMETINA E CEPALINA EM *Carapichea ipecacuanha* (BROT.) L. ANDERSSON (*Rubiaceae*)

GRAPHICAL ABSTRACT

The content of emetine and cephalin alkaloids in the roots of *Carapichea ipecacuanha* are affected by rainfall intensity and flowering and fruiting periods?

Christian N. Lameira[a,*], Osmar A. Lameira[b], Meiciane F. Campelo[c], Maria F. Dolabela[d] e Giselle M. R. Viana[e]

[a]Departamento de Farmacognosia, Centro Universitário Fibra, 66040-174 Belém – PA, Brasil.

[b]Laboratório de Biotecnologia, Embrapa Amazônia Oriental, 66095-903 Belém – PA, Brasil

[c]Universidade Federal do Pará, 66075-110 Belém – PA, Brasil.

[d]Institutto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará, 66075-110 Belém – PA, Brasil

[e]Seção de Parasitologia, Instituto Evandro Chagas, Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente, Ministério da Saúde, 67030-000 Ananindeua – PA, Brasil

INFLUENCE OF RAINFALL AND PHENOLOGY ON THE PROFILE OF EMETINE AND CEPHALIN IN *Carapichea ipecacuanha* (BROT.) L. ANDERSSON (RUBIACEAE)

Carapichea ipecacuanha popularly known as ipecac, poaia, ipecacuanha, is a plant recognized for its pharmacological properties and popular use, with high economic value and form being threatened with extinction. Currently there is a collection of the species cultivated in the Medicinal Plant Garden of Embrapa Eastern Amazon in the city of Belém, Pará state. The objective of the study was to chemically characterize samples from this collection, collected during the higher and lower rainfall, quantifying the levels of alkaloids emetine and cephaeline by means of high-performance liquid chromatography and to determine if the environmental condition and the phenological patterns that could interfere in the concentration of the alkaloid contents. The concentration of cephaeline and emetine alkaloids in the two analyzed periods were, respectively, in April 0.97% and 1.99% and in October 1.32% and 2.03%. There is also significant difference in the alkaloid content, 2.96% and 3.35% for the months April and October, respectively. However, the results demonstrate that the plant specimens have enough levels of alkaloids that can be used for commercial and research purposes.

Keywords: *Carapichea ipecacuanaha*; emetine; cephaeline, rainfall, phenological patterns.

INTRODUÇÃO

Carapichea ipecacuanha (Brot.) L. Andersson, popularmente conhecida como ipeca, poaia, ipecacuanha, dentre outras, é nativa de regiões úmidas e sombrias, encontradas em florestas tropicais, especialmente da América do Sul, como as do Brasil. A espécie é um subarbusto da família *Rubiaceae*, com altura média de 30 cm, suas raízes são amareladas ou esbranquiçadas, quando frescas, e acinzentadas quando sofrem desidratação. A espécie é reconhecida por seu uso popular, suas propriedades farmacológicas e alto valor econômico.[1-4] No Brasil, pode ser encontrada na floresta sob árvores de grande porte, principalmente, nos estados do Mato Grosso e Rondônia.[5] É uma espécie ameaçada de erosão genética e extinção, processo associado ao extrativismo irracional desde a sua descoberta, utilização e comercialização. Entretanto, por ser uma planta de fácil adaptação, ela pode ser utilizada como modelo para estudos em sistemas economicamente aproveitáveis da biodiversidade em áreas florestais com alta pressão econômica.[6]

Em suas raízes, diversos metabólitos secundários são encontrados, como: ácidos cítricos e málico, açúcares, amido, heterosídeo (ipecósido), resinas, saponinas, taninos (ácido ipecacuânhico), além dos alcaloides, especialmente os isoquinolínicos, este último, relacionados às propriedades terapêuticas da *C. ipecacuanha*, onde se destacam a emetina, cefalina e psicotrina, associados às atividades amebicida, anti-inflamatória e expectorante, o que lhe confere grande potencial comercial, sendo o Brasil um dos maiores exportadores mundiais desta espécie.[2,7-9]

Os relatos sobre as normas para coleta de plantas medicinais datam do Século IV a.C., onde a coleta do veneno da *Conium maculata* (cicuta) pelos carrascos gregos era realizada pela manhã, já que os níveis de coiina eram maiores.[10] É de conhecimento científico que os fatores ambientais como composição do solo, umidade, característica genética, índice pluviométrico, entre outros podem interferir na composição química e nos constituintes majoritários das espécies vegetais. Isto pode ser notado no perfil químico do óleo essencial de *Lippia alba*, *Lippia sidoides* e *Zingiber officinale*, influenciados pelo estágio de desenvolvimento da planta, por suas características genéticas, das estações do ano, da temperatura e do período de armazenamento, que interferiram na composição química e nos constituintes majoritários das espécies.[11,12]

A fenologia é o ramo da botânica responsável em estudar as diferentes fases do desenvolvimento das plantas, detalhando as épocas de ocorrência com suas respectivas características, pois os padrões fenológicos podem afetar a aptidão dos organismos que são dependentes dos vegetais.[13,14] Deste modo, o estudo dos padrões fenológicos facilita o

entendimento do meio, bem como das espécies vegetais que ali vivem, permitindo, por exemplo, o uso de estratégias para uso sustentável de espécies, avaliar os impactos climáticos sobre as comunidades,[15] compreender as relações destes padrões com as variações ambientais, fornecer informações para manejo adequado e preservação dos recursos genéticos.[16] Estudo realizado com amostras de *C. ipecacuanha* observou variações no padrão dos eventos fenológicos reprodutivos (significância, proporção e intensidade), correlacionadas às variáveis climáticas, especialmente a temperatura e a precipitação pluviométrica, interferindo de forma positiva ou negativa.[17]

Estudo com exemplares do gênero *Croton*, sobre a influência do ciclo circadiano e da sazonalidade, demonstraram alterações no rendimento, bem como na composição química dos óleos essenciais das espécies analisadas. Os achados sugerem que a condição ambiental pode interferir no rendimento e composição química dos óleos essenciais das espécies de *Croton* spp.[18]

O estresse hídrico é capaz de alterar a composição dos constituintes químicos presentes em plantas, pois pode favorecer a produção de vários tipos de metabólitos secundários, como glicosídeos cianogênicos, glucosinolatos, terpenoides, antocianinas e alcaloides. Isto foi observado nos estudos realizados com *Lippia sidoides*, onde o déficit hídrico alterou de modo significativo a produção de óleos essenciais e flavonoides,[19] alterações dependentes da intensidade e da duração do estresse, além da espécie submetida.[20] O excesso de chuva, por exemplo, pode acarretar diminuição das substâncias hidrossolúveis em folhas e raízes por lixiviação, técnica utilizada às plantas produtores de alcaloides e glicosídeos.[21,22] No caso dos alcaloides, a variação pode estar associada a fatores como a origem da planta, temperatura em que se cultiva e idade da raiz, que no caso da ipeca, o maior teor de alcaloides é encontrado na vida adulta da planta.[23]

Desse modo, avaliar o período de coleta de uma planta torna-se fundamental, já que o teor e a composição dos metabólitos secundários podem sofrer alterações influenciadas por fatores como estágio de desenvolvimento da planta, intensidade luminosa, pluviosidade, sazonalidade e temperatura. Assim, este estudo tem por objetivo determinar o teor dos alcaloides emetina e cefalina nas raízes de amostras de *C. ipecacuanha* coletadas em períodos de maior e menor índices de precipitação pluviométrica, associados à condição fenológica no período de colheita.

PARTE EXPERIMENTAL

Material botânico

Amostras das raízes de *C. ipecacuanha* foram obtidas de coleção cultivada no Horto de Plantas Medicinais da Embrapa Amazônia Oriental, na cidade de Belém, no estado do Pará, situado à 1°27´21´´S de latitude e 48°30´4´´W de longitude, com altitude em torno de 10 metros e temperatura média anual de 30°C. Exsicata da espécie se encontra depositada no Herbário IAN da Embrapa Amazônia Oriental sob registro Nº 197984. O estudo está registrado no SISGEN sob o nº A2C1D3D. As raízes da espécie foram coletadas nos meses de abril e outubro de 2018.

Extração dos alcaloides

Em cada período avaliado foi coletado em torno de 840g das raízes, que em seguida foram lavadas e o excesso de água foi retirado com papel toalha. Posteriormente, foram fragmentadas e levadas à estufa de secagem à temperatura de 60º C. O material foi pesado a cada 2 horas até que o peso se tornasse constante, obtendo-se 154g ao final do processo. A seguir, o material foi triturado e passado no tamis até a obtenção de pó.

O processo de extração foi realizado, conforme descrito por Martins (2000), onde 3 alíquotas de 100 mg de cada amostra foram submetidas à extração com 2 mL de NaOH 0,1M (Dinâmica) em tubo Falcon®, de 15 mL, por 1 minuto, sob agitação por Vortex. Depois disto, adicionou-se 10 mL de éter etílico e as amostras foram centrifugadas a 3000 RPM, por 5 minutos, a temperatura ambiente. Finalizado a centrifugação, a fase etérea, contendo os alcaloides, foi evaporada até secura em banho maria. Posteriormente, os resíduos obtidos, foram redissolvidos em acetonitrila (J.T. Baker) e filtrados em membrana Millipore de 0,22 µm (Merck) e armazenados em recipiente de vidro âmbar para HPLC.[24]

Solução padrão de emetina e cefalina

Padrões autênticos de emetina e de cefalina (10 mg cada) foram solubilizados com acetonitrila grau HPLC em um balão volumétrico de 10 mL (cada). A partir das soluções formadas, cinco soluções com concentrações entre 0,04 e 0,29 mg/mL foram analisadas em HPLC-DAD e os dados obtidos foram utilizados na construção da curva de calibração.

Separação, identificação e quantificação dos alcaloides

A quantificação simultânea da emetina e cefalina nos extratos foi realizada utilizando cromatógrafo líquido com detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD) Finnigan Surveyor (Thermo Fisher Scientific) equipado com amostrador automático. A separação cromatográfica foi desenvolvida em coluna LiChroCART® 250-4,6 Purospher® STAR RP-18E (5mm) *e pré-coluna* LiChroCART® Purospher® STAR RP-18E (Merck). A fase móvel foi composta de (A) tampão de acetato de sódio (Sigma-Aldrich) 0,25 M (pH = 5) e (B) acetonitrila, filtrados em membrana de 0,45 µm Sartolon Polyamid (Sartorius Biotech). O seguinte sistema de gradiente foi usado: B 10% de 0 a 2 min, B 10-60% de 2 a 8 min, B 60% de 8 a 14,1 min, B 60-10% de 8 a 20 min, 10% B é mantido por 0,1 min. A vazão foi de 0,8 mL/min e a coluna foi mantida à temperatura ambiente (21 ± 2ºC). A temperatura do amostrador automático foi mantida em 10°C e volume de injeção foi de 10 µL. A aquisição dos espectros no UV-Visível ocorreu na faixa de 200 a 600 nm e selecionou-se o comprimento de onda 280 nm para a obtenção dos cromatogramas com maior intensidade do pico. O software empregado na manipulação dos dados foi o Xcalibur™ 2.0 (Thermo Fisher Scientific).

Dados Climáticos

Na Figura 1 estão demonstrados os dados de temperatura e precipitação pluviométrica do ano de 2018, obtidos na estação de climatologia (Longitude: 48º 27' WGr e Altitude: 12,8 m) da Embrapa Amazônia Oriental em Belém/PA.

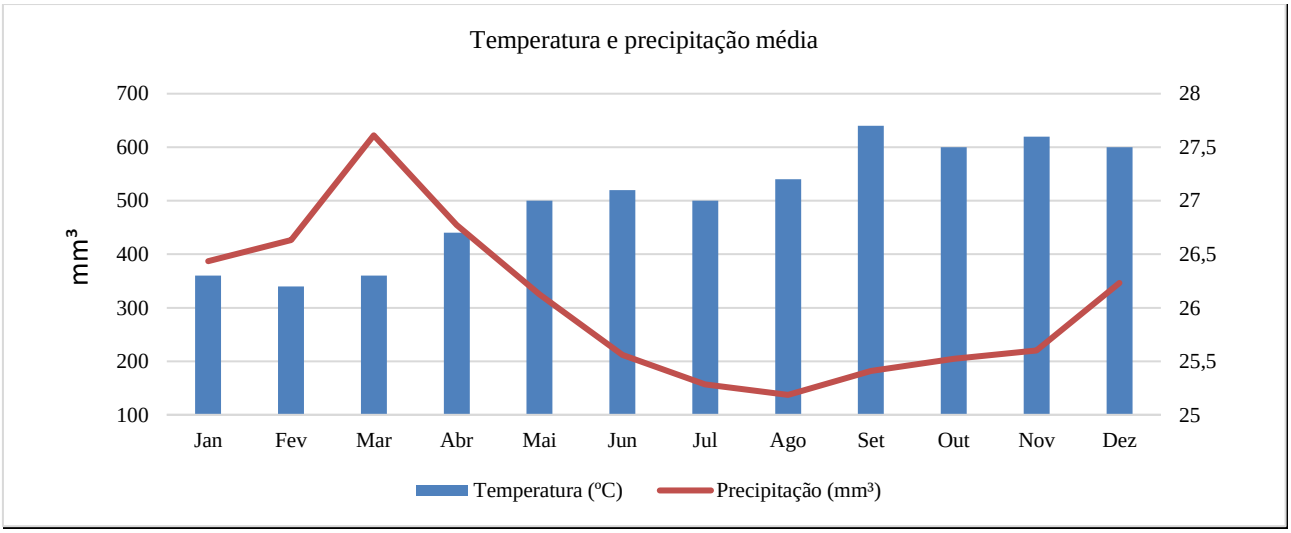


Figura 1. *Dados mensais de temperatura média (ºC) e precipitação pluviométrica (mm) obtidos na estação agrometeorológica da Embrapa Amazônia Oriental*

Padrão Fenológico

Na Figura 2, encontram-se os dados do padrão fenológico médio de *C. ipecacuanha* cultivada no Horto de Plantas Medicinais da Embrapa Amazônia Oriental, obtidos durante os meses de janeiro de a dezembro de 2018.

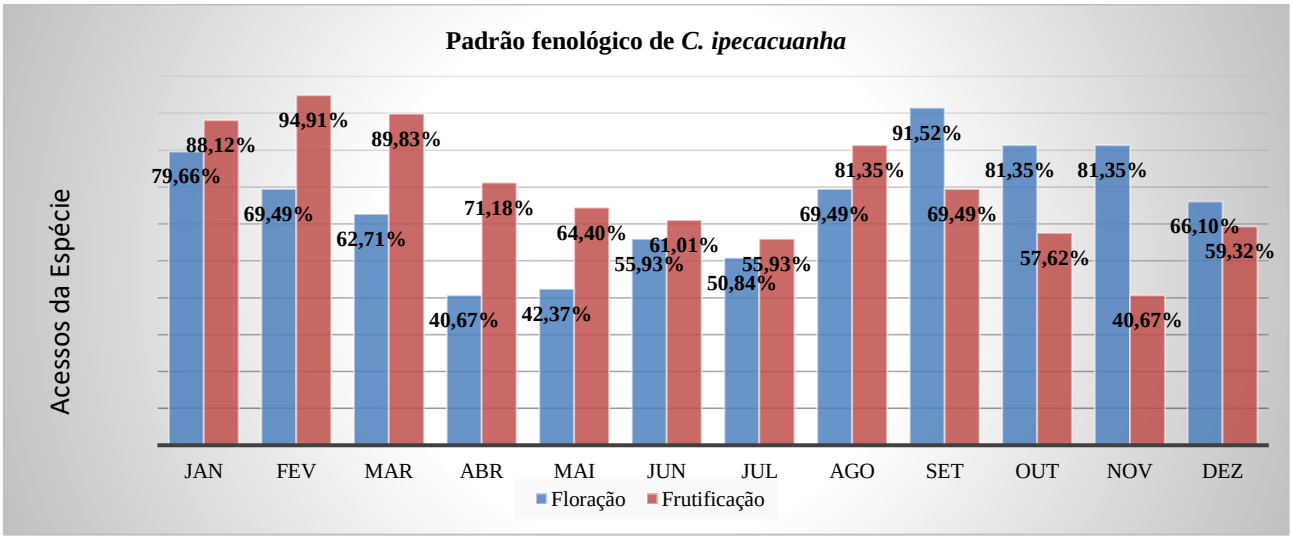


***Figura 2**. Padrão fenológico de C. ipecacuanha cultivadas no Horto de Plantas Medicinais da Embrapa Amazônia Oriental*

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1, os resultados estão apresentados na forma de estatística descritiva, como média ± desvio padrão para cefalina e emetina, bem como o teor das substâncias. A partir da observação das médias das concentrações dos alcaloides, constatou-se a variação química no teor entre os acessos analisados, conforme observado pela diferença estatística a partir da análise realizada pelo Teste de Tukey, para avaliar as diferenças entre os dados à 5% de probabilidade.

Todavia, em estudo anterior os ensaios evidenciaram a presença de alcaloides e taninos nos mesmos extratos em ambos os períodos avaliados (LAMEIRA *et al*.,2021), evidenciando que no período avaliado e na metodologia utilizada não ocorre influência da precipitação pluviométrica e da temperatura média sobre a composição qualitativa de metabólitos secundários nas raízes da *C. Ipecacuanha*. Diferente do observado no presente estudo, onde percebe-se a diferença no teor das substâncias analisadas.

A partir dos resultados, observa-se que a quantificação dos princípios ativos nas amostras deve ser feita considerando as condições ambientais, já que há diferença estatística significativa no teor dos alcaloides de *C. ipecacuanha*. A coleta das amostras durante os demais meses do ano,

e posterior à análise, poderá determinar se haverá diferenças consideráveis nos teores dos alcaloides presentes nas raízes da espécie conforme as mudanças ambientais (precipitação pluviométrica, temperatura, incidência de luz) no local de cultivo.

Tabela 1. Valores médios dos alcaloides cefalina e emetina determinados em cromatografia líquida de alta eficiência em amostras de *Carapichea ipecacuanha* obtidas em períodos de maior e menor precipitação pluviométrica

Amostra	Período de Coleta	Temperatura Média (ºC)	Precipitação Pluviométrica (mm)	Cefalina (%) Média ± DP	Emetina (%) Média ± DP	Teor % (Emetina + Cefalina)
1	Abril	26,7	454,4	0,97 ± 0,04 [b]	1,99 ± 0,06 [a]	2,96 ± 0,10 [b]
2	Outubro	27,5	204,4	1,32 ± 0,03 [a]	2,03 ± 0,03 [a]	3,35 ± 0,06 [a]

Médias seguidas por letras iguais nas colunas não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey à 5% de probabilidade. DP, desvio padrão.

Apesar de haver diferença estatisticamente significativa nas concentrações de Cefalina e no teor dos alcaloides (Emetina + Cefalina), tal diferença, não foi observada em relação a concentração de emetina. Entretanto, independentemente do período coletado, as raízes de *C. ipecacuanha* poderiam ser utilizadas, tanto para fins comerciais como para pesquisa, já que os teores obtidos do metabólito secundário foram superiores a 2%.

Apesar de haver diferença estatisticamente significativa nas concentrações de cefalina e no teor dos alcaloides (emetina + cefalina), tal diferença não foi observada em relação à concentração de emetina. Entretanto, independentemente do período coletado, as raízes de *C. ipecacuanha* poderiam ser utilizadas, tanto para fins comerciais como para pesquisa, já que os teores obtidos do metabólito secundário foram superiores a 2%.

Observou-se em exemplares de *C. ipecacuanha* brasileira, que os teores de cefalina e emetina variaram entre 0,6% e 0,74% e 1,47% e 1,70%, respectivamente. [25,26] Estes teores se assemelham aos observados em alguns acessos (708, 814 e 829) que compõe o BAG do Horto de Plantas Medicinais da Embrapa Amazônia Oriental, com teores de cefalina e de emetina que variam de 0,68-0,87% e 1,58-2,00%, respectivamente.[27] No presente estudo, o teor dos alcaloides cefalina e emetina apresentaram resultados superiores às médias brasileiras nos períodos avaliados e foram semelhantes aos acessos provenientes de Santíssima Trindade/MT (607), Costa Marques/RO (826) e Cerejeira/RO (845).[27] Por outro lado, em nenhum dos estudos

citados foram avaliados se a condição ambiental poderia interferir na concentração/teor dos alcaloides.

Em contraponto às demais pesquisas, onde foram utilizadas espécies/acessos únicos e selecionados de determinada região, no presente trabalho foram utilizadas raízes de exemplares diversos de *C. ipecacuanha*, independentemente de sua origem, fato que pode ser mais favorável que a utilização de amostras com teores dos alcaloides não tão elevados, em conjunto com exemplares com concentrações mais elevadas deste metabólito secundário, sem que isto interfira, necessariamente, na concentração mínima aceita pelo mercado.

A investigação sobre a produção dos alcaloides (cefalina e emetina) de *C. ipecacuanha* atrelados a fatores intrínsecos e extrínsecos já foi descrita em outros estudos.[23,28-30] Entretanto, nenhum destes obtiveram resultados mais expressivos que os observados no presente estudo.

O padrão fenológico dos exemplares de *C. ipecacuanha* demonstrados na Figura 1, culmina com a compreensão de que há comportamentos diferentes nos processos de frutificação e floração nos mesmos meses das coletas feitas no presente estudo, ocorrendo inversão nos percentuais dos dados, com maior percentual da frutificação no mês de abril e o da floração em outubro. Deste modo, o padrão fenológico pode contribuir com a variação das concentrações dos alcaloides analisados, já que se observou diferenças significativas nos resultados alcançados.

CONCLUSÕES

A análise das amostras de *C. ipecacuanha* cultivadas no Horto de Plantas Medicinais da Embrapa Amazônia Oriental e coletadas em dois períodos (abril e outubro) do ano de 2018 apresentou variação química estatisticamente significativa para os teores de cefalina e da razão emetina + cefalina, quando observados os teores médios dos alcaloides nas amostras analisadas (3,35% e 2,96%). Ademais, os teores observados foram superiores aos dados disponíveis na literatura, independente do período de coleta.

Os fatores intrínsecos (frutificação e floração) e extrínsecos (índice pluviométrico) inferem de modo significativo na diferença da concentração do alcaloide cefalina, entretanto com menor interferência nos teores de emetina.

As amostras, ora analisadas e cultivadas no Horto da Embrapa Amazônia Oriental, podem propiciar material genético com teores superiores a 2% de alcaloides para fins comerciais e de pesquisa.

AGRADECIMENTOS

A Embrapa Amazônia Oriental e ao Centro Universitário Fibra, por terem disponibilizado amostras, infraestrutura física e/ou laboratórios para apoio em algumas etapas do projeto técnico-científico.

REFERÊNCIAS

1. Huther, C. M.; Santos, C. M. P. P.; Pinho, C. F.; Lameira, O. A.; Machado, T. B.; Pereira, C. R.; *Anais do 6º Congresso Internacional de Agropecuária Sustentável*. Viçosa, Brasil, 2018.

2. Lameira, O. A.; *Circular técnica*, 28**,** Embrapa: Belém, 2002.

3. Sánchez, R. A. O.; *Anais do Riquezas del bosque: frutas, remédios y artesínias em américa latina center for international forestry research*. Santa Cruz, Bolívia, 2006.

4. Silva, P. C. da; Nascimento, T. O.; Krause, W.; Chaves, D. S. de A.; Silva, C. A.; *Acta Botanica Brasilica* **2019**, 33, 548. [https://doi.org/10.1590/0102-33062019abb0116]

5. Oliveira, L. O.; Venturini, B. A.; Rossi, A. A. B.; Hastenreiter, S. S.; *Genetics and Molecular Biology* **2010**, 33, 86. [https://doi.org/10.1590/S1415-47572009005000096]

6. Rocha, T. T.; Lameira, O. A.; *Resumos do 15° Seminário de Iniciação Científica da Embrapa*. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, Brasil, 2011.

7. Costa, A. F.; *Farmacognosia*, Vol. II. Fundação Calouste-Gulbenkian: Lisboa.1978.

8. Agra, M. F.; Silva, K. N.; Basílio, I. J. L. D.; França, P. F.; Barbosa-Filho, J. M.; *Revista Brasileira de Farmacognosia* **2008**, 18, 472. [https://doi.org/10.1590/S0102-695X2008000300023]

9. Silva, S. da; Alencar, D. C.; Benevides, P. J. C.; Astolfi-Filho, S.; *Revista Fitos* **2020**, 14, 45. [https://doi.org/10.32712/2446-4775.2020.799]

10. Fairbairn, J. W.; Suwal, P. N. (1961). *Phytochemistry* **1961**, 1, 38.

11. Tavares, E. S.; Julião, L. S.; Lopes, D.; Bizzo, H. R.; Lage, C. L. S.; Leitão, S. G.; *Revista Brasileira de Farmacognosia* **2005**, 15, 1. [https://doi.org/10.1590/S0102-695X2005000100002]

12. Coelho, A. A.; Tese de Doutorado. Universidade Estadual do Norte Fluminense, Brasil, 2019.

13. Stucky, B. J.; Guralnick, R.; Deck, J.; Denny, E. G.; Bolmgren, K.; Walls, R.; *Frontiers in Plant Science* **2018**, 9, 517. [https://doi.org/10.5380/revsbau.v17i3]

14. Neves, E. L. D.; Funch, L. S.; Viana, B. F.; *Brazilian Journal of Botany* **2010**, 33, 155. [https://doi.org/10.1590/S0100-84042010000100014]

15. Tannus, J. L.; Assis, M. A.; Morellato, L. P. C.; Fenologia reprodutiva em campo sujo e campo úmido numa área de cerrado no sudeste do Brasil, Itirapina-SP. *Biota Neotropica* **2006**, 6, 0. [https://doi.org/10.1590/S1676-06032006000300008]

16. Vieira, F. D. A.; Carvalho, D. D.; *Revista Árvore* **2009**, 33, 1015. [https://doi.org/10.1590/S0100-67622009000600004]

17. Campelo, M. F.; Lameira, O. A.; Moreira, R. K. V. P. P.; Ramires, A. C. S.; *Research,Society e Development* **2021**, 10, 1. [https://doi.org/10.33448/rsd-v10i5.14625]

18. Ribeiro, S. M.; Bonilla, O. H.; Lucena, E. M. P.; *Iheringia* **2018**, 73, 31. [http://dx.doi.org/10.21826/2446-8231201873104]

19. Alvarenga, I. C. A.; Valadares, R. V.; Martins, E. R.; Oliveira, F. G.; Figueiredo, L. S. de.; Kobayashi, M. K.; *Pesquisa Agropecuária Brasileira* **2011**, 46, 706. [https://doi.org/10.1590/S0100-204X2011000700005]

20. Lelis, R. T.; Freitas, S. P.; Prins, C. L.; Ferraz, T. M.; Campostrini, E.; Arantes, M. B. S.; Vieira, I. J. C.; *Revista Brasileira de Plantas Medicinais* **2016**, 18, 747. [https://doi.org/10.1590/1983-084X/0163]

21. Waterman, P. G., Mole, S.; *Analysis of phenolic plant metabolites*, 1st ed., Blackwell Scientific Publications: Oxford, 1994.

22. Evans, W. C.; *Trease and Evans' Pharmacognosy*, 16th ed., WB Saunders Company: London, 2009.

23. Silva, M. L.; Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Feira de Santana, Brasil, 2014.

24. Martins, E. R.; Tese de Doutorado. Universidade Estadual do Norte Fluminense, Brasil, 2000.

25. Skorupa, L. A.; Assis, M. C.; *Economic Botany* **1998**, 52, 209. [https://doi.org/10.1007/BF02861214]
26. Han, G-R.; Wang, Y-F.; Feng, S-H.; Jia, Y-X; *Chinese Herbal Medicines* **2013**, 5, 286. [https://doi.org/10.1016/S1674-6384(13)60042-8]

27. Paracampo, N. E. N. P.; Souza, L. R. S. de.; Almeida, J. C.; Lameira, O. A.; *Research, Society and Development* **2021**, 10, 1. [https://doi.org/10.33448/rsd-v10i15.23113]

28. Garcia, R. M. A.; Oliveira, L. O.; Moreira, M. A.; Barros, W. S.; *Biochemical Systematics and Ecology* **2005**, 33, 233. [https://doi.org/10.1016/j.bse.2004.08.005]

29. Duarte, G. C. A.; Dissertação de Mestrado. Universidade Federal Fluminense, Brasil, 2016.

30. Rosales-López, C.; Muñoz-Arrieta, R.; Abdelnour-Esquivel, A.; *Revista Colombiana de Quimica* **2020**, 49, 18. [https://doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v49n2.78347]

CAPÍTULO IV

Artigo a ser submetido à Revista Ciência & Saúde Coletiva

MÉTODOS *in vitro* PARA ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIMALÁRICA: REVISÃO INTEGRATIVA E ANÁLISE

Christian Neri Lameira - Lameira, C. N. - <christianlameira@live.com>.

Orcid: https://orcid.org/0000-0003-3126-9072

Nathália Nogueira Chamma Siqueira - Siqueira, N. N. C. - <nathaliachamma@iec.gov.br>.

Orcid: https://orcid.org/0000-0002-0738-0080

Marinete Marins Póvoa - Póvoa, M. M. - <povoamm@gmail.com>.

Orcid: https://orcid.org/0000-0003-3517-2227

Raphael Lobato Prado Neves - Neves, R. L. P. - <raphael.lobato@outlook.com>.

Orcid: https://orcid.org/0000-0002-0997-4851

Maria Fani Dolabela – Dolabela, M. F. - < fani@ufpa.br>.

Orcid: https://orcid.org/0000-0003-0804-5804

Giselle Maria Rachid Viana - Viana, G. M. R - <giselleviana@iec.gov.br>.

Orcid: https://orcid.org//0000-0003-1771-7211

RESUMO

A avaliação da atividade antimalárica de compostos com potencial ação farmacológica pode ser realizada por métodos *in vivo* e *in vitro*. No caso dos métodos *in vitro*, a finalidade principal é demonstrar os efeitos dos compostos avaliados sobre o metabolismo do parasito. Para isto, estão disponíveis vários ensaios *in vitro*, a título de exemplo pode-se citar os baseados na observação do desenvolvimento dos estágios sanguíneos do parasito em hemácias, ensaios isotópicos, quantificação de proteínas específicas do parasito e testes de intercalação no DNA.

Além da atividade antimalárica, a seletividade do composto avaliado em relação ao parasito também deve ser verificada, pois para que um composto antimalárico seja promissor, este não deve apresentar toxicidade em relação às células hospedeiras. O objetivo principal do artigo é compilar os métodos mais comumente empregados nos últimos cinco anos para avaliar a atividade antimalárica *in vitro* de compostos, bem como sintetizar as principais contribuições técnico-científicas sobre o tema, de maneira sistemática e ordenada. Para isto, realizou-se uma revisão integrativa da literatura vigente, nas bases de dados BVS, SciELO, Redalyc e PMC, com temática relacionada aos métodos *in vitro* para avaliar a atividade antimalárica, a partir de artigos originais publicados nos últimos cinco anos (2018 a 2023), disponíveis eletronicamente e gratuitamente na íntegra, escritos em língua portuguesa, espanhola ou inglesa. Ao final da revisão, foram selecionados 31 artigos que atenderam aos critérios de inclusão. A partir deste acervo de 31 artigos elegíveis, observou-se que o método de cultivo contínuo desenvolvido por Trager & Jansen (1976), modificado ou não, e o de sincronização de Lambros & Vanderberg (1979) continuam sendo as metodologias mais usuais. O ensaio de citotoxicidade MTT é o principal método utilizado para determinar a segurança da droga testada. De acordo com os dados aportados pelos artigos selecionados, houve o desenvolvimento de somente um novo ensaio, que foi o de indução ou produção de gametócitos. E, em relação aos métodos *in vitro* envolvidos na avaliação da atividade antimalárica, os principais procedimentos empregados incluíram os colorimétricos (pLDH e HRP2), SYBR Green I e microteste da OMS.

Palavras-chave: *Plasmodium* sp., Atividade antimalárica, Métodos *in vitro*.

ABSTRACT

The evaluation of the antimalarial activity of compounds with potential pharmacological action can be performed by *in vivo* and *in vitro* methods. In the case of *in vitro* methods, the main

purpose is to demonstrate the effects of the evaluated compounds on the metabolism of the parasite. For this, several *in vitro* tests are available, for example those based on the observation of the development of the parasite's blood stages in red blood cells, isotopic assays, quantification of specific proteins of the parasite and DNA intercalation tests. In addition to the antimalarial activity, the selectivity of the evaluated compound in relation to the parasite must also be verified, because for an antimalarial compound to be promising, it must not present toxicity in relation to the host cells. The main objective of the article is to compile the most used methods in the last five years to evaluate the *in vitro* antimalarial activity of compounds, as well as to synthesize the main technical-scientific contributions on the subject, in a systematic and orderly manner. For this, an integrative review of the current literature was carried out, in the BVS, SciELO, Redalyc and PMC databases, with a theme related to *in vitro* methods to evaluate antimalarial activity, based on original articles published in the last five years (2018 to 2023), available electronically and free of charge in full, written in Portuguese, Spanish or English. At the end of the review, 31 articles that met the inclusion criteria were selected. From this collection of 31 eligible articles, it was observed that the continuous cultivation method developed by Trager & Jansen (1976), modified or not, and the synchronization method by Lambros & Vanderberg (1979) remain the most common methodologies. The MTT cytotoxicity assay is the main method used to determine the safety of the tested drug. According to the data provided by the selected articles, there was the development of only one new test, which was the induction or production of gametocytes. And, regarding the *in vitro* methods involved in the evaluation of antimalarial activity, the main procedures used included colorimetric methods (pLDH and HRP2), SYBR Green I and WHO microtest.

Keywords: *Plasmodium* sp., Antimalarial activity, *In vitro* methods.

INTRODUÇÃO

Há diversos métodos para determinar a atividade de compostos contra o *Plasmodium* sp. Mas, independentemente da metodologia empregada, um dos objetivos principais é avaliar a densidade parasitária pós-tratamento com o composto ou fármaco de interesse. As formas habituais de avaliação da provável ação farmacológica são por meio de ensaios *in vivo* e *in vitro*. Além disto, deve-se ter em mente que as espécies do gênero *Plasmodium* são espécie-específicas ou espécie seletivas, isto é, as espécies que infectam o hospedeiro humano são diferentes daquelas que geram a infecção em roedores, por exemplo. E este conhecimento é crucial para a escolha do método adequado para a avaliação da atividade antimalárica1.

Em relação aos métodos *in vitro*, primordiais para análise de compostos ou desenvolvimento de fármacos, estes são testes não invasivos, exceto pela necessidade da coleta de amostra sanguínea e, fundamentalmente, livres de risco para o indivíduo. Esta abordagem isenta, quase na totalidade, a interferência de fatores relacionados ao hospedeiro, a título de exemplo da imunidade e metabolismo do hospedeiro referente ao composto. Portanto, os métodos *in vitro* proporcionam uma avaliação direta do impacto (ou efeito) do composto ou fármaco analisado. Para fins de cultivo contínuo do parasito, o método desenvolvido por Trager & Jensen (1976)8 e a técnica de microcultura desenvolvida por Rieckmann *et al*. (1978)51 são os procedimentos normalmente adotados1,2,3.

Para além dos métodos já citados, diversos métodos *in vitro* são habitualmente empregados para a avaliação da inibição do crescimento de estágios morfológicos do *P. falciparum*, a saber: A- Contagem de esquizontes por meio da Gota Espessa (GE), método tradicionalmente denominado como ensaio-padrão de maturação de esquizontes da Organização Mundial de Saúde (OMS); B- Ensaios isotópicos, por meio da incorporação de precursores de ácido nucleico marcado com radioisótopos (hipoxantina radiomarcada, por exemplo); C- Quantificação de proteínas específicas do parasito, como a proteína 2 rica em histidina (HRP2)

e lactato desidrogenase (LDH), por meio de ensaios imunoenzimáticos (ELISA); e D- Intercalação no DNA com o uso de corantes intercalantes da dupla fita do ácido nucleico1,2,3,4. Diante do repertório de métodos *in vitro* disponíveis para avaliar a atividade antimalárica de diversos compostos ou fármacos, a escolha de determinado método deve levar em consideração a sensibilidade do teste, o tempo de cultivo, a densidade parasitária inicial, o método de identificação, a demanda de equipamentos, infraestrutura laboratorial, *expertise* dos microscopistas, etc.5. Assim sendo, este estudo teve por finalidade compilar os métodos mais comumente empregados nos últimos cinco anos para avaliar a atividade antimalárica *in vitro* de compostos ou fármacos, as modificações realizadas no decorrer do tempo, bem como sintetizar as principais contribuições técnico-científicas sobre o tema, de maneira sistemática e ordenada.

METODOLOGIA

Trata-se de um estudo de revisão integrativa da literatura, com a finalidade de sintetizar o conhecimento aportado nos últimos cinco anos (período de 2018 até fevereiro de 2023) sobre o tema em questão6. Para isto, as etapas metodológicas contemplaram seis passos, a saber: 1- Identificação do tema e seleção da questão norteadora da pesquisa, 2- Estabelecimento dos critérios de inclusão e exclusão, 3- Verificação dos estudos pré-selecionados, 4- Avaliação dos estudos selecionados e definição das informações a serem extraídas destes estudos, a fim de inclusão e/ou ajustes das variáveis que compõe o banco de dados elaborado, visando o refinamento dos dados obtidos, 5- Análise e interpretação dos resultados e 6- Consolidação da revisão e síntese do conhecimento.

A coleta de dados ocorreu entre outubro de 2022 a janeiro de 2023, por meio de busca *online* de artigos científicos, orientada pela pergunta norteadora: Quais os principais métodos *in vitro* para análise da atividade antimalárica de compostos ou fármacos? Para isto, foram pesquisados

artigos científicos indexados nas seguintes bases de dados: 1- Biblioteca Virtual em Saúde – BVS (MEDLINE e LILACS), 2- *Scientific Electronic Library Online* – SciELO, 3- Redalyc (Rede de Revistas Científicas da América Latina, Caribe, Espanha e Portugal) e 4- *US National Library of Medicine National Institutes of Health* (PMC). Estas bases indexadoras foram selecionadas por reunirem grande parte das publicações de impacto na área de interação em ciências da saúde. Como filtro, utilizou-se o espaço temporal compreendido de 2018 a 2023, no intuito de fornecer um rol de informações técnico-científicas atualizadas em relação ao tema central da revisão integrativa.

Os critérios de inclusão adotados foram: temática relacionada aos métodos *in vitro* disponíveis para análise da atividade antimalárica; publicações com disponibilidade eletrônica e na íntegra; artigo original, escritos em língua portuguesa, espanhola ou inglesa. Foram excluídos os editoriais, cartas ao editor, estudos reflexivos, relatos de experiência, revisões, publicações duplicadas, teses e dissertações, bem como estudos que não abordassem a temática relevante ao objetivo da revisão.

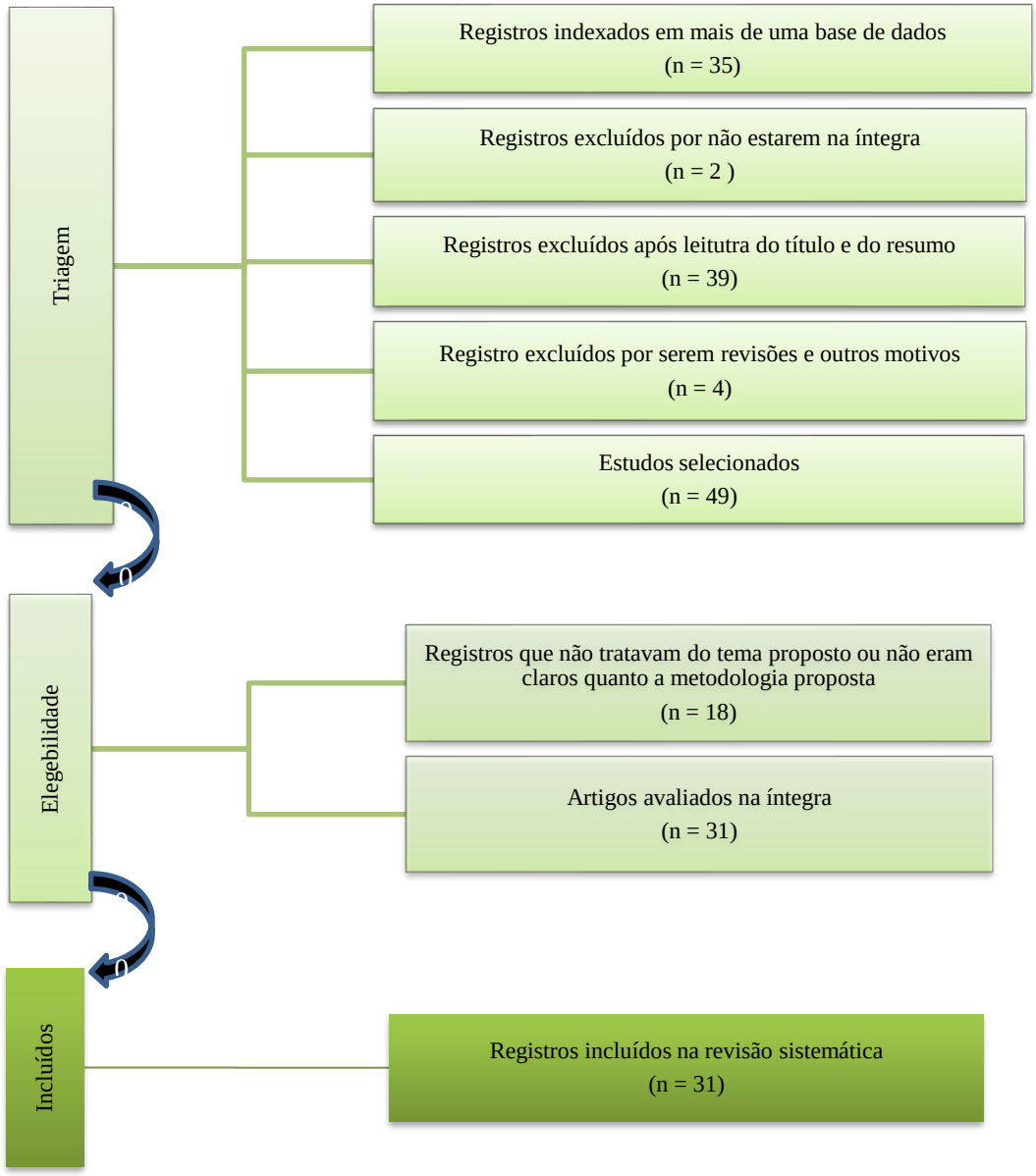
Após a elaboração da pergunta norteadora, definição dos critérios de inclusão e exclusão, a etapa de verificação dos estudos publicados foi conduzida com os seguintes descritores em saúde (DeCS): *in vitro assay* e *antimalarial activity for drugs*, *in vitro methods for antimalarial activity*, e *antimalarial in vitro assay methods*, vinculados aos operadores booleanos “AND’ e ‘OR”, individualmente ou combinados, com a finalidade de responder à pergunta norteadora informada anteriormente. Em seguida, os artigos pré-selecionados foram categorizados e tabulados cronologicamente em uma planilha do programa Microsoft Excel 2013, para posterior análise, interpretação dos achados alcançados pelos autores e, finalmente, compilação do acervo de conhecimento gerado pelos trabalhos publicados. Desta forma, todos os métodos *in vitro* que foram empregados para triagem de compostos/fármacos foram incluídos no estudo. Para eliminar a duplicidade, o título e o resumo de todos os estudos pesquisados foram

examinados duas vezes às cegas e as listas de referências dos artigos selecionados foram adicionalmente revisadas para estudos mais relevantes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

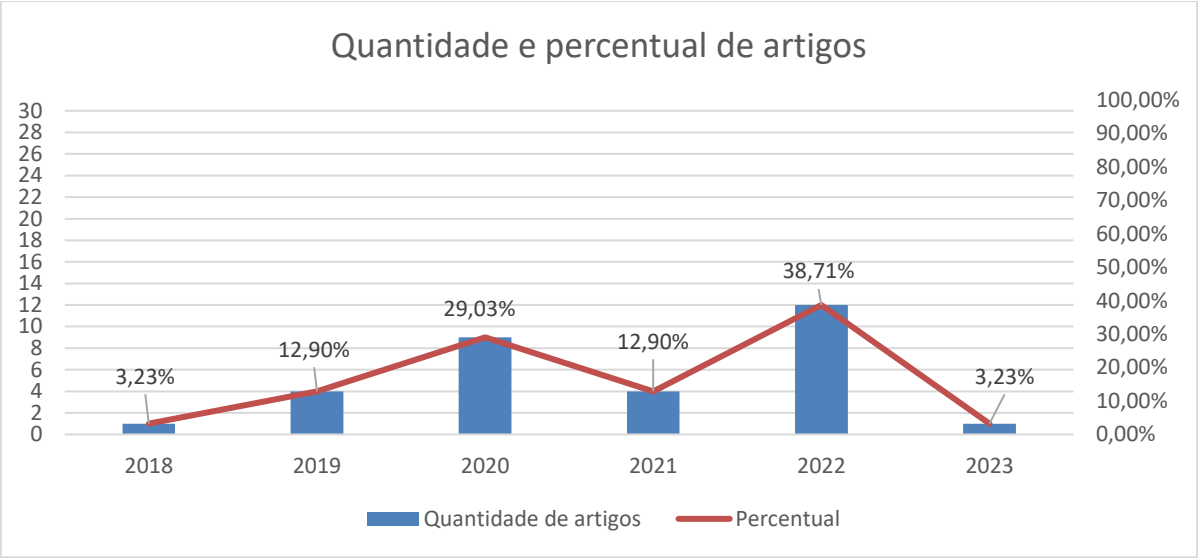
As pesquisas nas bases de dados utilizadas viabilizaram o levantamento do quantitativo inicial de 129 artigos aderentes à temática central, sendo 65 resultados da base de dados MEDLINE, 4 na LILACS, 58 do PMC e 2 na SciELO. Após a leitura dos títulos e resumos, com base na pergunta norteadora, descritores e filtro, foram pré-selecionados 49 artigos, porém 18 não atendiam aos critérios de inclusão e foram rejeitados. Assim, foram incluídos para elaboração desta revisão integrativa 31 artigos e todo este acervo foi publicado na língua inglesa. A Figura 1 ilustra os passos metodológicos realizados, conforme exposto a seguir.

Figura 1. Fluxograma para mostrar os critérios de seleção utilizadas na revisão sistemática.



A Figura 2 retrata o levantamento das publicações selecionadas, conforme a distribuição temporal por ano de publicação, compreendendo o período de 2018 a 2023. Como observado, a maior frequência de publicação dos estudos ocorreu no ano de 2022, correspondendo a 38,71% (12/31) dos artigos, seguidos pelos 29,03% (09/31) dos artigos publicados em 2020.

Figura 1. Distribuição percentual dos artigos sobre os métodos *in vitro* para avaliar a atividade antimalárica de compostos ou fármacos por ano de publicação, no período de 2023 a 2018.



O quantitativo de estudos relacionados aos ensaios *in vitro* para avaliação da atividade antimalárica demonstra tendência de ascensão, com leve declínio em 2021, possivelmente, em decorrência da diminuição dos recursos orçamentários destinados às pesquisas científicas com outros agravos que não os direcionados às ações emergenciais relacionadas ao SARS-CoV-2 e à COVID-19.

O Quadro 1 foi elaborado com o propósito de compilar os estudos sobre o tema central desta revisão integrativa de forma cronológica, em consonância às informações sumarizadas das principais evidências científicas sobre o tema métodos *in vitro* para avaliação da atividade antimalárica. Os atributos extraídos dos 31 artigos selecionados foram: título, tipo de estudo, abordagem adotada pela pesquisa, autores e ano de publicação.

Quadro 1. Artigos selecionados pela revisão integrativa, segundo título, tipo de estudo, abordagem adotada pela pesquisa, autores e ano de publicação, no período de 2023 a 2018.

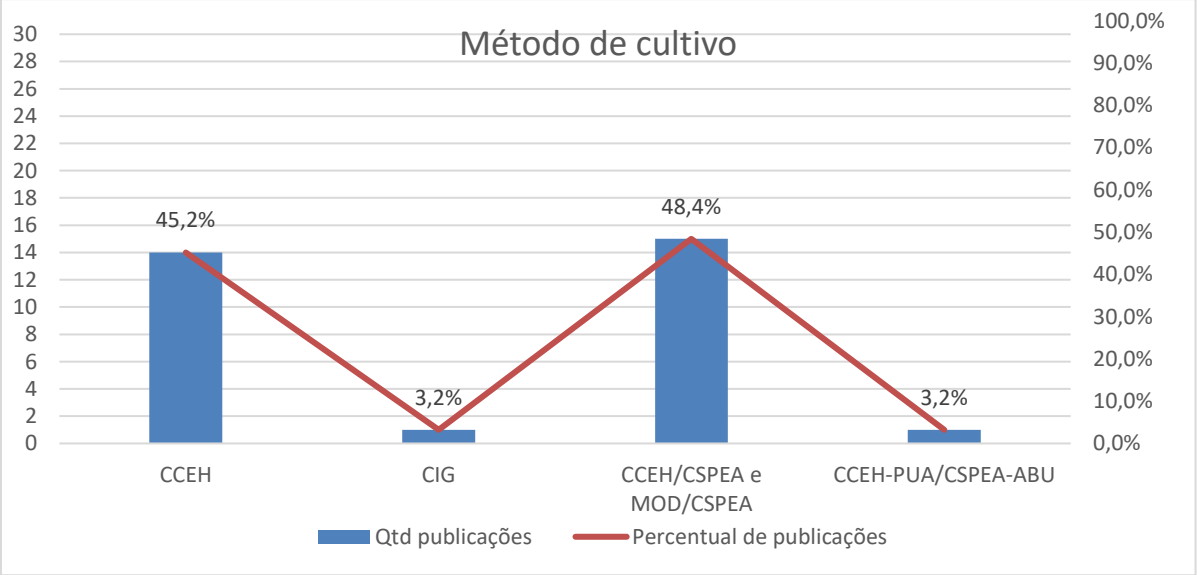
Título do artigo	**Téc. Cult. *in vitro***	**Ens. Inib. paras. *in vitro***	**Referência e ano**
Antimalarial efficacy and toxicological assessment of medicinal plant ingredients of Prabchompoothaweep remedy as a candidate for antimalarial drug development	CCEH	pLDH; MTT-V; IS	Chaniad *et al*., 2023
Anti-malarial investigation of Acorus calamus, Dichapetalum gelonioides, and Leucas aspera on Plasmodium falciparum strains	CCEH	HRP2	Zamil *et al*., 2022
Antimalarial potential of compounds isolated from *Mammea siamensis* T. Anders. flowers: in vitro and molecular docking studies	CCEH	pLDH; MTT-V	Chaniad *et al*., 2022
Antiplasmodial activity and cytotoxicity of plant extracts from the Asteraceae and Rubiaceae families	CCEH	pLDH; MTT-V	Chaniad *et al*., 2022
Antiplasmodial Properties of Aqueous and Ethanolic Extracts of Ten Herbal Traditional Recipes Used in Thailand against *Plasmodium falciparum*	CCEH	pLDH; MTT-H/V; pRBCs	Phuwajaroanpong *et al*., 2022
Assessment *In Vitro* of the Antimalarial and Transmission-Blocking Activities of Cipargamin and Ganaplacide in Artemisinin-Resistant *Plasmodium falciparum*	CIG	SYBR72	Yipsirimetee *et al*., 2022
Blood-stage antiplasmodial activity and oocyst formation-blockage of metallo copper-cinchonine complex	MOD; CSPEA	ABA	Morais *et al*., 2022
Effect of geranylated dihydrochalcone from Artocarpus altilis leaves extract on Plasmodium falciparum ultrastructural changes and mitochondrial malate: Quinone oxidoreductase	CCEH; CSPEA	AAP24; IEE; AEVA; MTT- DLD; AAPfMQO.	Hidayati *et al*., 2022
Ellagic Acid Induces *In vitro* Alkalinisation of the Digestive Vacuole in Drug-Sensitive Plasmodium falciparum Strain	CCEH-PUA; CSPEA-ABU	SYBR; MpHVD	Muchtar *et al*., 2022
Evaluation of the antimalarial activity and toxicity of Mahanil-Tang-Thong formulation and its plant ingredients	CCEH	pLDH; MTT-V.	Chaniad *et al*., 2022
In vitro and in silico assessment of new beta amino ketones with antiplasmodial activity	CCEH; CSPEA	SYBR; MTT-WI26VA4; IS	Krombauer *et al*., 2022
In Vitro Evaluation of Two Novel Antimalarial Derivatives of SKM13: SKM13-MeO and SKM13-F	CCEH; CSPEA	MTT-V; FACS	Trinh *et al*., 2022
In vitro and i*n vivo* antimalarial activities of *Avicennia africana* P. Beauv. (Avicenniaceae) ethanolic leaf extract	CCEH	SYBR	Ahmed *et al*., 2022
Antimalarial properties and molecular docking analysis of compounds from *Dioscorea bulbifera* L. as new antimalarial agent candidates	CCEH	EIH; MTT-V	Chaniad *et al*., 2021
Dehydrobufotenin extracted from the Amazonian toad *Rhinella marina* (Anura: Bufonidae) as a prototype molecule for the development of antiplasmodial drugs	CCEH; CSPEA	AAP96; MTT-W; IS.	Banfi *et al*., 22021
Quinolinotriazole antiplasmodials via click chemistry: synthesis and *in vitro* studies of 7-Chloroquinoline-based compounds	CCEH; CSPEA	pLDH; MTT-H	Pereira *et al*., 2021
Synthesis, Molecular Docking, and Antimalarial Activity of Hybrid 4-Aminoquinoline-pyrano[2,3-c]pyrazole Derivatives	CCEH	pLDH; MTT-V	Shamsuddim *et al*, 2021
Analysis of the active fraction of Iranian *Naja naja oxiana* snake venom on the metabolite profiles of the malaria parasite by ^{1}HNMR *in vitro*	CCEH; CSPEA	MTT-HEK; AAP96	Hajialiani *et al*., 2020
Antiplasmodial and Cytotoxic Activities of Extracts of Selected Medicinal Plants Used to Treat Malaria in Embu County, Kenya	CCEH	MIIH	Waiganjo *et al*., 2020

Comparison of the antimalarial activity of a Colombian traditional Uitoto remedy with laboratory preparations	CCEH; CSPEA	AAP96	Rodriguez *et al*., 2020
In Vitro Antimalarial and Toxicological Activities of *Quercus infectoria* (Olivier) Gall Extracts	CCEH	SYBR; MTT-N	Zin *et al*., 2020
In Vitro and *In Vivo* Antimalarial Activities and Toxicological Assessment of *Pogostemon Cablin* (Blanco) Benth	CCEH; CSPEA	pLDH; MTT-V	Phuwajaroanpong, *et al*., 2020
Investigation of antimalarial activity and cytotoxicity profiling of a Bangladeshi plant Syzygium cymosum	CCEH; CSPEA	HRP2; MTT-V	Hossainey *et al*., 2020
Piperaquine resistant Cambodian *Plasmodium falciparum* clinical isolates: in vitro genotypic and phenotypic characterization	CCEH	HRP2; GRD; VNCG; RSA; EDC	Boonyalai *et al*., 2020
The potential antimalarial efficacy of hemocompatible silver nanoparticles from *Artemisia* species against *P. falciparum* parasite	CCEH; CSPEA	CECD	Avitabile *et al*., 2020
Ultrastructural alterations in *Plasmodium falciparum* induced by chalcone derivatives	CCEH; CSPEA	AHI	Sinha *et al*., 2020
Docking predictions based *Plasmodium falciparum* phosphoethanolamine methyl transferase inhibitor identification and in-vitro antimalarial activity analysis	CCEH; CSPEA	AAP96; MTT-HEK	Singh *et al*., 2019
In Vitro and In Vivo Antimalarial Activity of LZ1, a Peptide Derived from Snake Cathelicidin	CCEH	AAP96; APQ	Fang *et al*., 2019
In Vitro Assessment of Antiplasmodial Activity and Cytotoxicity of *Polyalthia longifolia* Leaf Extracts on *Plasmodium falciparum* Strain NF54	CCEH	SYBR; MTT-HC	Kwansa-Bentum *et al*., 2019
Novel Synthetic Polyamines Have Potent Antimalarial Activities *in vitro* and *in vivo* by Decreasing Intracellular Spermidine and Spermine Concentrations	CCEH; CSPEA	EIH	El Bissati *et al*., 2019
Commercial drugs containing flavonoids are active in mice with malaria and *in vitro* against chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum*	CCEH; CSPEA	HPR2; MTT-BGM	Coutinho, Aguiar, Krettli, 2018

Legenda: **técnicas de cultivo *in vitro***: CCEH (Cultura contínua em eritrócitos humanos em meio RPMI. Trager & Jensen, 1976); MOD (Cultura contínua em eritrócitos humanos em meio RPMI modificado. Andrade-Neto *et al*., 2003); CIG (Cultivo para indução de gametócitos. Yipsirimetee *et al*., 2022); CSPEA (Cultivo sincronizado de parasitos em estágio de anel. Lambros e Vanderberg, 1979); CCEH-PUA (Cultura contínua em eritrócitos humanos em meio RPMI. Pua *et al*., 2020); CSPEA-ABU (Cultivo sincronizado de parasitos em estágio de anel. Abu-Bakar *et al*. 2013). **Ensaios de inibição parasitária *in vitro***: pLDH (ens. *in vitro* de *Plasmodium* lactato desidrogenase); MTT-V (ens. de citotox. MTT em células Vero); IS (índice de seletividade). HPR2 (ens. teste anti-HRP2 ELISA); MTT-H/V (ens. de citotox. MTT em células HepG2 e Vero); pRBCs (ens. de medicação de oxidante intracelular em pRBCs); SYBR72 (ens. de fluorescência SYBR Green I de 72 horas); ABA (citotox. pelo Alamar Blue Assay); AAP24 (ativ. antimalárica em cultivo em placa de 24 poços); MTT-DLD (ens. de citotox. em células DLD-1); IEE (ens. de inibição do desenv. do estágio eritrocitário); AEVA (ens. de alt. estruturais dos vacúolos alimentares); AAPfMQO (ativ. antimalárica contra Pf MQO recombinante); SYBR (ens. de fluorescência SYBR Green I); MpHVD (med. do pH do vacúolo digestivo); MTT-W (ens. de citotox. MTT em células WI-26VA4); FACS (ens. de sel. de células ativadas por fluorescência); EIH (ens. de incorporação de ^{3}H-hipoxantina); AAP96 (ens. antimalárico *in vitro* em placa de 96 poços; MTT-H (ens. de citotox. MTT em células HepG2); MTT-HEK (ens. de citotox. MTT em células HEK-293); MIIH (ens. de microdiluição semiautomática *in vitro* p/ inib. da incorporação de ^{3}H-hipoxantina); MTT-N (ens. de citotox. MTT em células NIH/3T3); GRD (Genotipagem de resistência a drogas); VNCG (ens. de var. do núm. de cópias de genes); RSA (ens. de sobrev. em fase de anel): EDC (ens. de drogas combinadas); CECD (cult. na fase de anel e isol. frescos de *P. falciparum* exp. a conc. das drogas); AHI (aval. de hc infec. por parasitas em estágio de anel, expostas às drogas); APQ (Ensaio da atividade da piruvato quinase); MTT-HC (Ensaio de citotoxicidade MTT em glóbulos vermelhos); MTT-BMG (Ensaio de citotoxicidade MTT em células BMG).

A Figura 3 representa a síntese dos métodos de cultivo utilizados pelos artigos selecionados, em que se observa que o cultivo contínuo de eritrócitos humanos em meio RPMI (CCEH), descrito por Trager & Jensen (1976)8 e o método CCEH modificado ou não, associado ao cultivo sincronizado de parasitos em estágio de anel (CSPEA), descrito por Lambros & Vanderberg (1979)9, foram os ensaios que apresentaram maior frequência pelo acervo de artigos consultados, com 45,2% (14/31) e 48,4% (15/31), respectivamente.

Figura 3. Distribuição da frequência dos métodos de cultivo adotados pelo desenho metodológico dos artigos selecionados, no período de 2023 a 2018.



Legenda: CCEH (Cultura contínua em eritrócitos humanos em meio RPMI. Trager & Jensen, 1976); MOD (Cultura contínua em eritrócitos humanos em meio RPMI modificado. Andrade-Neto *et al*., 2003); CIG (Cultivo para indução de gametócitos. Yipsirimetee *et al*., 2022); CSPEA (Cultivo sincronizado de parasitos em estágio de anel. Lambros e Vanderberg, 1979); CCEH-PUA (Cultura contínua em eritrócitos humanos em meio RPMI. Pua *et al*., 2020); CSPEA-ABU (Cultivo sincronizado de parasitos em estágio de anel. Abu-Bakar *et al*. 2013)

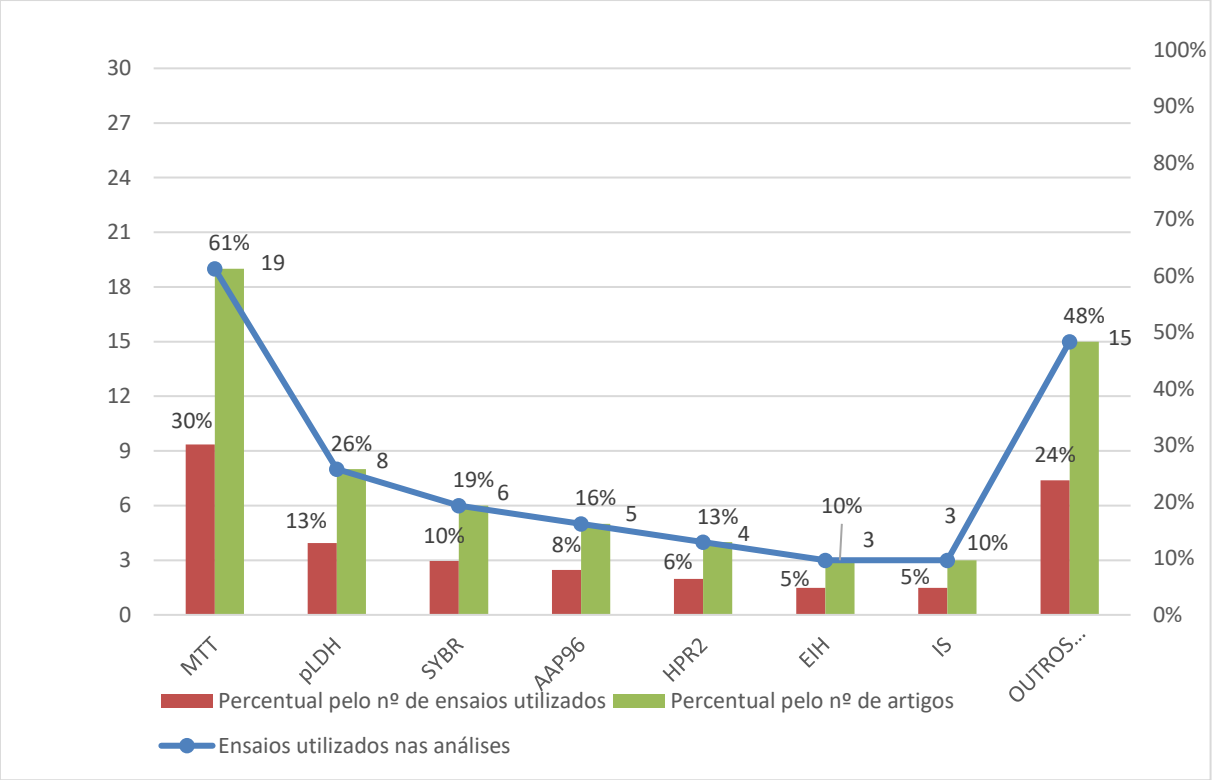
No que se refere ao cultivo contínuo de clones e cepas do parasito, a metodologia descrita desde a década de 70 por Trager & Jensen (1976)8 e por Lambros & Vanderberg (1979)9 continua sendo a mais usual. Após a descrição destes métodos, nova metodologia foi descrita apenas por Yipsirimetee *et al*. (2022)10, que desenvolveram o cultivo para indução de gametócitos (estágios sexuados do parasito). Os gametócitos são os estágios infectantes para o vetor anofelino e, portanto, essenciais para a transmissão da malária em determinada área. A maioria dos antimaláricos atuais demonstram atividade gametocitocida limitada aos estágios iniciais e

baixa ou nenhuma atividade sobre o gametócito maduro. Portanto, a busca por novos compostos que demonstrem atividade sobre gametócitos, independente do estágio de desenvolvimento, é imprescindível. Para isto, o desenvolvimento de métodos *in vitro* reprodutíveis que possibilitem a produção ou indução de gametócitos viáveis, como o proposto por Yipsirimetee *et al*. (2022)10, assim como permitam avaliar a sensibilidade de gametócitos em estágio inicial e maduro, é uma prioridade no contexto do aprimoramento dos métodos de cultivo e avaliação da atividade antimalárica. Ainda em relação aos métodos usuais, a cultura contínua em eritrócitos humanos em meio RPMI foi modificada pela última vez pelo grupo de Pua *et al*. (2020)11 e o cultivo sincronizado de parasitos em estágio de anel por Abu-Bakar *et al*. (2013)12. Neste sentido, a principal modificação em relação aos protocolos adotados pelos métodos habituais foi a utilização de amostra sanguínea A+ 13,14 ao invés de O+13-42.

A análise gráfica conjunta dos métodos de cultivo e de avalição da atividade antimalárica utilizados nas abordagens metodológicas descritas nos artigos selecionados está representada no Figura 4. Nos 31 estudos selecionados, 63 métodos foram utilizados para determinar a eficácia da drogas.

Destaca-se o ensaio de citotoxicidade (MTT) como o método mais empregado nos estudos, com frequência de 30%. Considerando o percentual de preleção entre todos os métodos utilizados nos estudos, o ensaio de citotoxicidade é o preferencialmente empregado, com 61% de utilização pelo acervo de artigos selecionados.

Figura 4. Métodos de análises de drogas utilizados nos ensaios.



Legenda: pLDH (ens. *in vitro* de *Plasmodium* lactato desidrogenase); MTT (ens. de citotoxicidade MTT em células diversas); IS (índice de seletividade); HPR2 (ens. teste anti-HRP2 ELISA); SYBR (ens. de fluorescência SYBR Green I); EIH (ens. de incorporação de ^{3}H-hipoxantina); AAP96 (ens. antimalárico *in vitro* em placa de 96 poços; **outros**: pRBCs (ens. de medicação de oxidante intracelular em pRBCs); ABA (citotox. pelo Alamar Blue Assay); AAP24 (ativ. antimalárica em cultivo em placa de 24 poços); IEE (ens. de inibição do desenv. do estágio eritrocitário); AEVA (ens. de alt. estruturais dos vacúolos alimentares); AAPfMQO (ativ. antimalárica contra Pf MQO recombinante); MpHVD (med. do pH do vacúolo digestivo); FACS (ens. de sel. de células ativadas por fluorescência); GRD (Genotipagem de resistência a drogas); VNCG (ens. de var. do núm. de cópias de genes); RSA (ens. de sobrev. em fase de anel): EDC (ens. de drogas combinadas); CECD (cult. na fase de anel e isol. frescos de *P. falciparum* exp. a conc. das drogas); AHI (aval. de hc infec. por parasitas em estágio de anel, expostas às drogas); APQ (Ensaio da atividade da piruvato quinase).

Diante desse panorama, o procedimento metodológico mais frequentemente empregado foi o ensaio de citotoxicidade MTT, com alterações somente relacionadas à escolha do cultivo celular utilizado, isto é: MTT em células Vero (células epiteliais renais de macaco africano21,22,27,30,32,34,38-40,42); MTT em células HepG2 (linhagem celular imortal de câncer hepático humano28,38); MTT em células DLD-1 (linhagem celular de adenocarcinoma colorretal36); MTT em células WI-26VA4 (fibroblastos de pulmão humano29,33); MTT em células HEK-293 (células de rim embrionário humano18,26); MTT em células NIH/3T3 (fibroblastos embrionários de camundongos23); MTT em glóbulos vermelhos16; e MTT em células BMG (linhagem celular de rim de macaco13).

Esses métodos *in vitro*, em que os parasitos são expostos a diferentes concentrações pré-

estabelecidas do composto ou fármaco a ser avaliado e os produtos do parasito ou parâmetros de desenvolvimento e/ou crescimento parasitário são analisados43,44, podem ser utilizados para triagem de extratos vegetais, frações e substâncias puras, tendo a vantagem de utilizar a espécie *P. falciparum* sem a necessidade de grandes volumes das amostras, além de permitir a observação da morfologia do parasito, bem como da densidade parasitária1,49-52.

Conforme observado pelo rol de artigos selecionados, há quatro métodos *in vitro* mais frequentemente utilizados para determinação da atividade antimalárica, os quais mantém o princípio básico comum e se diferenciam somente pela forma de avaliação do crescimento/inibição parasitária, são estes: 1- Método da OMS, conhecido também como microteste e baseado na avaliação do crescimento parasitário pela maturação de trofozoíto jovem a esquizonte viável e leitura por microscopia óptica53; 2- Métodos isotópicos, que tem como princípio a incorporação de hipoxantina marcada radioativamente pelos parasitos54; 3- Métodos colorimétricos, baseados na detecção e aferição de proteínas do parasito43; e 4- Método do SYBR Green I, que se fundamenta na fluorescência que a molécula SYBR Green I emite quando se intercala nas cadeias de DNA dos parasitos55.

Em relação às características técnicas concernentes a cada método, os testes *in vitro* tradicionais são os ensaios de maturação de esquizontes da OMS (microteste) e o isotópico, que avaliam os processos metabólicos do parasito em cultivo de curto ou longo tempo. Porém, embora o primeiro seja muito útil em inquéritos epidemiológicos, viabilize a avaliação da morfologia dos parasitos, bem como da densidade parasitária, e tenha boa reprodutibilidade, trata-se de um método laborioso, não pode ser utilizado efetivamente em pacientes que tenham tomado antimaláricos nos últimos 30 dias e não é útil para avaliações de antimaláricos em larga escala. Já no ensaio isotópico, os parasitos são expostos a uma hipoxantina radioativa que é incorporada pelos estágios morfológicos do parasito e avaliados em beta-cintilador56. Embora este ensaio tenha surgido para reduzir a carga de trabalho do microteste, viabilizando um ensaio rápido, sensível e capaz de utilizar sangue diretamente dos pacientes ou parasitos provenientes de

cultivos, apresenta como principal limitação a utilização de radioisótopos, o que exige a licença da Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN) para a compra do material radioativo e de homologação da infraestrutura laboratorial onde será realizado o ensaio, elevando o custo deste método e dificultando a utilização no campo, devido necessitar de estrutura e reagentes específicos51,54,57,58.

Assim, diante dos fatores técnicos, logísticos, operacionais, etc., que podem limitar ou mesmo impossibilitar o emprego dos métodos supramencionados, alguns grupos de pesquisa optam pelo emprego dos métodos colorimétricos, como foi o caso dos 13% dos artigos que empregaram os ensaios baseados na produção da enzima pLDH e dos 6% que utilizaram os ensaios baseados na proteína HRP2. Em linhas gerais, a principal vantagem dos testes baseados em pLDH e HRP2 é a ausência de microscopia, que requer equipamento de boa manutenção, capacidade técnica, reagentes de boa qualidade e um número considerável de lâminas. Quanto às principais limitações ou mesmo desvantagens, estas incluem o fato dos resultados dos testes serem essencialmente qualitativos e não fornecerem informações prognósticas, como o estadiamento do parasito. Contudo, como são testes rápidos em comparação ao microteste e ao método isotópico, podem ser aplicados como método de triagem, principalmente, diante de grande quantidade de compostos ou fármacos a serem avaliados5,43,59,60.

A pLDH é uma enzima glicolítica produzida pelas formas sexuadas e assexuadas do parasito e é expressa em níveis elevados no estágio eritrocítico, sendo uma das primeiras enzimas plasmodiais relatadas como distintas eletroforeticamente, imunologicamente e cineticamente daquelas do hospedeiro, podendo ser usada como indicador da presença do plasmódio e do crescimento parasitário61,62. É produzida apenas por parasitos vivos, onde os níveis de pLDH estão associados à densidade parasitária e demonstra um rápido decréscimo com o início da terapêutica, o que a torna um bom marcador para seguimento de infecção ativa. Diferencia *P. falciparum* de outras espécies de *Plasmodium* sp., devido às diferenças antigênicas entre as isoformas da pLDH5,57,60-62. Ensaios baseados em pLDH podem ser úteis como uma

estratégia rápida e fácil para a triagem de substâncias ativas pela identificação dos antígenos do parasito na circulação sanguínea60-66.

Já a HRP2 é uma proteína rica em histidina e alanina, expressa por trofozoítos e gametócitos imaturos de *P. falciparum*. Esta proteína é secretada ativamente no sangue, como antígeno solúvel em água, mesmo durante o desaparecimento das hemácias infectadas nos vasos sanguíneos. Um problema potencial para os ensaios baseados em HRP2 é a persistência do antígeno detectável por até várias semanas após a eliminação do parasito. Portanto, este longo tempo de meia-vida associado à persistência desta proteína mesmo em pacientes tratados com sucesso terapêutico, limitam a utilização da HRP2 para monitoramento da eficácia terapêutica. Entretanto, para testes de suscetibilidade *in vitro*, a estabilidade desta proteína é uma grande vantagem. Porém, o fator limitador é que se trata de proteína secretada e liberada especificamente pelo *P. falciparum*5,43. Os ensaios envolvendo a proteína HRP2 são mais sensíveis que outros ensaios como, por exemplo, o isotópico. Este teste está diretamente ligado a densidade parasitária e sua evolução. Além do mais, os protocolos envolvendo a HRP2 são mais duradouros (em torno de 72h) do que os outros métodos (comumente 48h), tornando-o um ensaio factível para testar compostos de ação lenta, sem que haja qualquer alteração no protocolo vigente70. Por outro lado, o surgimento e propagação das populações de *P. falciparum* com deleção do gene que secreta a proteína HRP2 impõem mais um desafio à adoção dos métodos baseados em HRP2 para avaliação da atividade antimalárica71-73.

No presente estudo, houve a utilização do método do SYBR Green I ou *DNA dye intercalation assays* em 10% dos artigos selecionados. É um método que possibilita a triagem de compostos ou fármacos de alto rendimento contra a malária, realizado em sistemas automatizados, que permitem quantificar o crescimento do parasito por meio da fluorescência de corantes que se ligam ou intercalam aos ácidos nucleicos do *Plasmodium55,*67,68. Dentre o acervo de métodos *in vitro* disponíveis para análise da atividade de antimaláricos, os considerados mais exigentes incluem os métodos isotópico, HRP2-ELISA e o SYBR Green I e, mesmo assim, todos estão

sujeitos a diversas variabilidades dos dados. A razão principal para estas variabilidades e subjetividade nas interpretações podem estar relacionadas às diferenças nos protocolos dos métodos de ensaio, condições distintas de estrutura laboratorial, utilização de diferentes clones e cepas de parasitos que culminarão com fenótipos variáveis, dentre outras divergências provenientes, por exemplo, das habilidades técnicas do executor5,43,44,57. Em contrapartida, as propriedades do composto ou fármaco avaliado, a título de exemplo da solubilidade, diferença de pH, mecanismo de ação, biodisponibilidade, desencadeiam efeitos positivos ou negativos dependentes do método adotado, juntamente com a interpretação dos resultados14,70.

Quanto à biomassa do parasito, métodos alternativos para se quantificar os parasitos da malária têm sido desenvolvidos baseados, principalmente, na coloração de parasitos intraeritrocitários com diferentes corantes de ácidos nucléicos, seguidos pela análise por citometria de fluxo. Esta técnica de análise celular automatizada, baseada em laser, permite a avaliação simultânea de múltiplas propriedades físicas e bioquímicas individuais de células suspensas em meio líquido69.

Afora às questões apresentadas, outro desafio a ser superado é como extrapolar os achados dos ensaios *in vitro* para os *in vivo* (sistemas biológicos intactos). Em face disto, deve-se ter um olhar cuidadoso em relação à seleção e otimização dos protocolos para avaliação da atividade antimalárica; pois diante de compostos ou fármacos que necessitem de ativação metabólica, os ensaios de avaliação *in vitro* podem ser mais difíceis, embora a cultura primária de hepatócitos e outras técnicas possam suplantar este problema. Ademais, há a possibilidade da adoção de modelos matemáticos para auxiliar na melhor correlação *in vitro–in vivo*70. Outra análise que é importante no contexto de estudo dos fatores associados à suscetibilidade do *Plasmodium* sp. aos antimaláricos é a determinação das concentrações da droga analisada no soro, plasma ou sangue total por meio da técnica de Cromatografia Líquida de Alta Resolução (HPLC), que permite uma abordagem efetiva dos parâmetros farmacocinéticos da droga investigada no

decorrer do tempo de acompanhamento do tratamento utilizado68.

Em resumo, a importância da utilização dos ensaios *in vitro* para a vigilância em saúde está fundamentada na possibilidade de realizar análises de variações temporais e espaciais da suscetibilidade dos plasmódios a diferentes compostos ou fármacos, baseadas na comparação das concentrações destes compostos ou fármacos capazes de inibir o crescimento do parasito (determinação do IC50 - Concentração Inibitória para o crescimento de 50% dos parasitos ou IC90 - Concentração Inibitória para o crescimento de 90% dos parasitos). Assim, usando as ferramentas *in vitro*, é possível monitorar a emergência e/ou as variações nos perfis de suscetibilidade aos compostos ou fármacos avaliados, independente da correlação precisa com as respostas de eficácia terapêutica43,44.

Quanto à principal limitação da presente revisão integrativa, deve-se considerar que as informações apresentadas são, principalmente, reflexo do acervo de 31 artigos já mencionados. Porém, em que pese esta limitação, os artigos analisados apresentam essencialmente o delineamento da análise sistemática sobre o conhecimento já estabelecido em pesquisas anteriores sobre a temática de interesse. Ademais, viabilizaram um documento consolidado de evidências científicas e estudos já publicados, contribuindo para a ampliação do conhecimento, baseado nos achados alcançados pelas pesquisas anteriores6.

Assim, observa-se que por meio da análise de todos esses métodos relatados e independente das limitações e/ou deficiências citadas, os métodos *in vitro* são procedimentos basilares nos processos de avaliação da atividade antimalária e descoberta de novos compostos ou fármacos. Pois, estes procedimentos aportam o conhecimento direto em relação ao *status* potencial de um dado composto/fármaco; permitem que vários compostos, como os oriundos de espécimes vegetais utilizadas na medicina tradicional, com diferentes mecanismos de ação, possam ser testados e, dependendo do rendimento do ensaio empregado, viabilizam uma análise completa da associação concentração-efeito; e tudo isto é fundamental para o fornecimento de dados que irão aportar as análises subsequentes em sistemas fenotípicos ou *in vivo* altamente complexos.

Portanto, pode-se elencar como principais vantagens dos métodos *in vitro* as seguintes: simplicidade, conveniência (avaliação de grande número de compostos simultaneamente), eficiência, possibilidade de automação, fornecimento de melhor avaliação da atividade intrínseca de um composto ou fármaco, etc.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A avaliação *in vitro* para determinação da possível atividade farmacológica de compostos ou fármacos, bem como os parâmetros de toxicidade (análises de citotoxicidade e genotoxicidade) são os procedimentos primários e fundamentais envolvidos no processo de descoberta e desenvolvimento de novos compostos ou fármacos. Pois, estes métodos fornecem o conhecimento específico relacionado ao cenário potencial do composto ou fármaco avaliado. Entretanto, a escolha do método *in vitro* deve se basear em parâmetros como: sensibilidade do teste, tempo de cultivo, seletividade do composto ou fármaco analisado, densidade parasitária inicial, método de identificação, equipamentos e insumos disponíveis, infraestrutura, capacidade técnica disponível, etc.

De acordo com o acervo de artigos selecionados, as metodologias descritas por Trager & Jensen (1976) e Lambros & Vanderberg (1979) continuam sendo os métodos de eleição para o estabelecimento do cultivo contínuo e sincronização dos clones e cepas do parasito, com a finalidade de dar seguimento às etapas metodológicas envolvidas na determinação da atividade antimalárica. Durante o período de 2018 a 2023, houve o desenvolvimento de somente um novo ensaio, que foi o de indução ou produção de gametócitos.

Quanto aos métodos *in vitro* envolvidos na avaliação da atividade antimalárica, os principais procedimentos empregados incluíram os colorimétricos (pLDH e HRP2), SYBR Green I e microteste da OMS, além dos ensaios de toxicidade por meio do protocolo MTT, que apresentam um fundamento comum e estão sujeitos a diversas variabilidades de dados. No entanto, são procedimentos considerados de simples execução, eficientes, que permitem a

observação do efeito sinérgico ou antagônico com associações ou combinações de compostos e melhor avaliação da atividade intrínseca do potencial composto ou fármaco avaliado.

REFERÊNCIAS

1. Dolabela C. Techniques to validate the use of plants as antimalarial. **Intern. Med.** 2021; 11(4): 1-2.

2. Jimenez A, Rees-Channer RR, Perera R, Gamboa D, Chiodini PL, González I.J., *et al*. Analytical sensitivity of current best-in-class malaria rapid diagnostic tests. **Malaria Jounal**. 2017; 16(128).

3. Le Bras J, Deloron P, Hartmann JF, Coulanges P, Dourado HV, Larouze B. Application of na semi-microtest to the study of drug sensitivity of 66 isolates from 15 countries. **Trans R Soc Trop Med Hyg**. 1984; 78(4): 485-8.

4. Best PW, Pinto PL. Diminished *Plasmodium falciparum* sensitivity to quinine exposure *in vitro* and in a sequential multi-drug regimen: a preliminary investigation in Guyana, South America. **Int J Infect Dis**. 2018; 12(6): 27-31.

5. Nogueira F.; Do Rosário VE. Methods for assessment of antimalarial activity in the different phases of the *Plasmodium* life cycle. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**. 2010; 1(3): 109-124.

6. Sousa LMM, Firmino CF, Marques-Vieira CMA, Severino SSP, Pestana HCFC. Revisões da literatura científica: tipos, métodos e aplicações em enfermagem. **Rev. Port. Enf. Reab.** 2018; 1(1): 45-54.

7. WHO. **World Malaria Report 2022**. Geneva: World Health Organization, 2022.

8. Trager W, Jensen JB. Human malaria parasites in continuous culture. **Science**.1976; 193(4254): 673-75.

9. Lambros C, Vanderberg JP. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. **J. Parasitol**, 1979; 418-20.

10. Yipsirimetee A, Chiewpoo P, Tripura R, Lek D, Day NPJ, Dondorp AM, Pukrittayakamee S, White NJ, Chotivanich K. Assessment *In Vitro* of the Antimalarial and Transmission-Blocking Activities of Cipargamin and Ganaplacide in Artemisinin-Resistant *Plasmodium falciparum.* **Antimicrob Agents Chemoter**. 2022 March 15; 66(3): e-01481-21.

11. Pua JY, Abu-Bakar N, Nik Kamarudin NAA, Ghazali SZ, Khairul MFM. Long cryopreserved lab-adapted *Plasmodium falciparum* increases resistance to chloroquine but not its susceptibility. **Life Sci Med Biomed**. 2020; 4(9).

12. Abu-Bakar N, Klonis N, Tilley L. Does artemisinin alter the pH of the malaria parasite digestive vacuole. **Malaysian J Micro**. 2013 April 18; 9(1): 112-116.

13. Coutinho JP, Aguiar, ACC, Krettli AU. Commercial drugs containing flavonoids are active in mice with malaria and *in vitro* against chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum.* **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 2018 October 5; 113(12): e180279.

14. Sinha S, Radotra BD, Medhi B, Batovska, DI, Markova N, Sehgal R. Ultrastructural alterations in *Plasmodium falciparum* induced by chalcone derivatives. **BMC Res Notes**. 2020; 13:290.

15. El Bissati K, Redel H, Ting L-M, Lykins JD, McPhillie MJ, Upadhya R, Woster PM, Yarlett N, Kim K, Weiss LM. Novel Synthetic Polyamines Have Potent Antimalarial Activities *in vitro* and *in vivo* by Decreasing Intracellular Spermidine and Spermine Concentrations. **Front Cell Infect Microbiol.** 2019 February 14. 9(9)

16. Kwansa-Bentum B, Agyeman K, Larbi-Akor J, Anyigba C, Appiah-Opong R. *In Vitro* Assessment of Antiplasmodial Activity and Cytotoxicity of *Polyalthia longifolia* Leaf Extracts on *Plasmodium falciparum* Strain NF54. **Malar Res Treat.** 2019 January 21; 2019:ID6976298.

17. Fang Y, He X2, Zhang P, Shen C, Mwangi J, Xu C, Mo G, Lai R, Zhang Z. In Vitro and In Vivo Antimalarial Activity of LZ1, a Peptide Derived from Snake Cathelicidin. **Toxins.** 2019 June 30; 11:379.

18. Singh J, Mansuri R, Vijay S, Sahoo GC, Sharma A, Kumar M. Docking predictions-based *Plasmodium falciparum* phosphoethanolamine methyl transferase inhibitor identification and in-vitro antimalarial activity analysis. **BMC Chem.** 2019; 13:43

19. Avitabile E, Senes N, D'Avino C, Tsamesidis I, Pinna A, Medici S, Pantaleo A. The potential antimalarial efficacy of hemocompatible silver nanoparticles from *Artemisia* species against *P*. *falciparum* parasite. **Plos One.** 2020 September 01; 15(9).

20. Boonyalai N, Vesely BA, Thamnurak C, Praditpol C, Fagnark W, Kirativanich K, Saingam P, Chaisatit C, Lertsethtakarn P, Gosi1 P, Kuntawunginn W, Vanachayangkul P, Spring MD, Fukuda MM, Lon C, Smith PL, Waters NC, Saunders DL, Wojnarski M. Piperaquine resistant Cambodian *Plasmodium falciparum* clinical isolates: in vitro genotypic and phenotypic characterization. **Malaria Journal** 2020; 19:269.

21. Hossainey MRH, Sazed SA, Nima MK, Rahman MS, Ashraf MT, Chowdhury AA, Rashid MA, Haque R, Alam MS. Investigation of antimalarial activity and cytotoxicity profiling of a Bangladeshi plant Syzygium cymosum. **J. Infect Dev Ctries.** 2020 May 12; 14(8)924-928.

22. Phuwajaroanpong A, Chaniad P, Horata N, Muangchanburee S, Kaewdana K, Punsawad C. *In Vitro* and *In Vivo* Antimalarial Activities and Toxicological Assessment of *Pogostemon Cablin* (Blanco) Benth. **J Evided Based Integr Med.** 2020 November 10; 25:1-8.

23. Zin NNINM, Mohamad MN, Roslan K, Sazeli AW, Moin NIA, Alias A, Zakaria Y, Abu-Bakar N. In Vitro Antimalarial and Toxicological Activities of *Quercus infectoria* (Olivier) Gall Extracts. **Malays J Med Sci.** 2020 August 19; 27(4):36-50.

24. Rodríguez ZJ, Rodríguez YV, García JO, Arias MH, Deharo E, Garavito G. Comparison of the antimalarial activity of a Colombian traditional Uitoto remedy with laboratory preparations. **J Vector Born Dis.** 2020 June; 57:170-175.

25. Waiganjo B, Moriasi G, Onyancha J, Elias N, Muregi F. Antiplasmodial and Cytotoxic Activities of Extracts of Selected Medicinal Plants Used to Treat Malaria in Embu County, Kenya. **J. Parasitol. Res.** 2020 July 7; 2020.

26. Hajialiani F, Elmi T, Mohamadi M, Sadeghi S, Shahbazzadeh D, Ghaffarifar F, Dalimi A, Arjmand M, Tabatabaie F, Zamani Z. Analysis of the active fraction of Iranian *Naja naja oxiana* snake venom on the metabolite profiles of the malaria parasite by ^{1}HNMR *in vitro*. **Iran J Basic Med Sci.** 2020; 23(4):534-543.

27. Shamsuddin MA, Ali AH, Zakaria NH, Mohammat MF, Hamzah AS, Shaameri Z, Lam KW, Mark-Lee WF, Agustar HK, Razak MRMA, Latip J, Hassan NI. Synthesis, Molecular Docking, and Antimalarial Activity of Hybrid 4-Aminoquinoline-pyrano[2,3-c]pyrazole Derivatives. **Pharmaceuticals.** 2021 November 17; 14:1174.

28. Pereira GR, Ferreira ACG, Nevesa PHAS, Gomes EBS, Nascimento MFA, Sousa JAC, Santos JO, Brandão GC, Oliveira, AB. Quinolinotriazole antiplasmodials via click chemistry: synthesis and *in vitro* studies of 7-Chloroquinoline-based compounds. **Bras. J Pharm Sci**. 2021;57:e181086.

29. Banfi FF, *et al*. Dehydrobufotenin extracted from the Amazonian toad *Rhinella marina* (Anura: Bufonidae) as a prototype molecule for the development of antiplasmodial drugs. **J Venom Anim Tox Incl Trop Dis.** 2021 January 08; 27: e20200073

30. Chaniad P, Mungthin M, Payaka A, Viriyavejakul P, Punsawad C. Antimalarial properties and molecular docking analysis of compounds from *Dioscorea bulbifera* L. as new antimalarial agent candidates. **BMC Complement Med Ther.** 2021; 21:144

31. Ahmed MA, Ameyaw EO, Ackah-Armah F, Acheampong DO, Amoani B, Ampomah P, Adakudugu EA, Adokoh CK. *In vitro* and *in vivo* antimalarial activities of *Avicennia africana* P. Beauv. (Avicenniaceae) ethanolic leaf extract. **J Tradit Complement Med.** 2022 December 3; 12(2022):391-401.

32. Trinh T-TT, Kim Y-a, Hong H, Le LTT, Jang H, Kim S-A, Park H, Kim HS, Yeo S-J. In Vitro Evaluation of Two Novel Antimalarial Derivatives of SKM13: SKM13-MeO and SKM13-F. **Korean J Parasitol.** 2022 November 22; 60(6):401-407.

33. Krombauer GC, Guedes KS, Banfi FF, Nunes RR, Fonseca AL, Siqueira EP, Bellei JCB, Scopel KKG, Varotti FP, Sanchez BAM. In vitro and in silico assessment of new beta amino ketones with antiplasmodial activity. **Rev Soc Bras Med Trop.** 2022 June 22; 55: e0590-2022.

34. Chaniad P, Phuwajaroanpong A, Techarang T, Horata N, Chukaew A, Punsawad C. Evaluation of the antimalarial activity and toxicity of Mahanil-Tang-Thong formulation and its plant ingredients. **BMC Complement Med Ther.** 2022; 22:51

35. Muchtar NH, Zin NNINM, Mohamad FS, Abu-Bakar N. Ellagic Acid Induces in vitro Alkalinisation of the Digestive Vacuole in Drug-Sensitive Plasmodium falciparum Strain. **Malays J Med Sci.** 2022 August 09; 29(4):43-52.

36. Hidayati AR, *et al*. Effect of geranylated dihydrochalcone from Artocarpus altilis leaves extract on Plasmodium falciparum ultrastructural changes and mitochondrial malate: Quinone oxidoreductase. **Int J Parasitol Drugs Drug Resist.** 2022 December 8; 21(2023):40-50.

37. Morais CMG, *et al*. Blood-stage antiplasmodial activity and oocyst formation-blockage of metallo copper-cinchonine complex. **Front Cell Infect Microbiol.** 2022 December 01; 12:1047269.

38. Phuwajaroanpong A, Chaniad P, Plirat W, Phoopha S, Septama AW, Chukaew A, Punsawad C. Antiplasmodial Properties of Aqueous and Ethanolic Extracts of Ten Herbal Traditional Recipes Used in Thailand against *Plasmodium falciparum*. **Trop Med Infect Dis.** 2022 December 4; 7:417.

39. Chaniad P, Phuwajaroanpong A, Techarang T, Viriyavejakul P, Chukaew A, Punsawad C. Antiplasmodial activity and cytotoxicity of plant extracts from the Asteraceae and Rubiaceae families. **Helyon.** 2022 January 24; 8(2022): e08848.

40. Chaniad P, Chukaew A, Payaka A, Phuwajaroanpong A, Techarang T, Plirat W, Punsawad C. Antimalarial potential of compounds isolated from *Mammea siamensis* T. Anders. flowers: in vitro and molecular docking studies. **BMC Complement Med Ther**. 2022; 22:266

41. Zamil MF, Sazed SA, Hossainey MRH, Biswas A, Alam MS, Khanum H, Barua P. Anti-malarial investigation of Acorus calamus, Dichapetalum gelonioides, and Leucas aspera on Plasmodium falciparum strains. **J. Infect Dev Ctries.** 2022; 16(11):1768-177

42. Chaniad P, Techarang T, Phuwajaroanpong A, Plirat W, Viriyavejakul P, Septama AW, Punsawad C. Antimalarial efficacy and toxicological assessment of medicinal plant ingredients of Prabchompoothaweep remedy as a candidate for antimalarial drug development. **BMC Complement Med Ther.** 2023; 23:12.

43. Noedl, H, Wernsdorfer WH, Millrt RS, Wongsrichanalai C. Histidine-rich protein II: a novel approach to malaria drug sensitivity testing. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 46: 1658-1664, 2002.

44. Basco LK. **Field application of *in vitro* assays for the sensitivity of human malaria parasites to antimalarial drugs.** World Health Organization/WHO, 2007. 202 p.

45. Nussenzweig R, Herman R, Vanderberg J, Yoeli M, Most H. Studies on sporozoite-induced infections of rodent malaria. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 15 (5): 684-689, 1966.

46. Martinelli A, Culleton R. Non-human primate malaria parasites: out of the forest and into the laboratory. **Parasitology**, 145 (1): 41-54, 2018.

47. WHO. **Malaria vector control and personal protection: report of a WHO study group.** WHO technical report series, 936. Geneva. 2006.

48. Labbé AC, Bualombai P, Pillai DR, Zhong KJY, Vanisaveth V, Hongvanthong B, Looareesuwan S, Kain KC. Molecular markers for chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* malaria in Thailand and Laos. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, 95 (8): 781-788, 2001.

49. WHO. **In vitro micro-test (Mark III) for the assessment of the response of *Plasmodium falciparum* to chloroquine, mefloquine, quinine, amodiaquine, sulfadoxine/pyrimethamine and artemisinin**. Geneva Switzerland. 2001.

50. Lauffer MK. Monitoring Antimalarial Drug Efficacy: Current Challenges. **Current Infectious Diseases Reporter**, 11 (1): 59–65, 2009.

51. Rieckmann KH, Sax LH, Camp GH, Mrema JE. Drug sensitivity of *Plasmodium falciparum.* An *in vitro* micro technique. **The Lancet**, 1: 22-23, 1978.

52. Russell BM, Udomsangpetch R, Rieckmann KH, Kotecka BM, Coleman RE, Sattabongkot J. Simple *in vitro* assay for determining the sensitivity of *Plasmodium vivax* isolates from fresh human blood to antimalarials in areas where *P. vivax* is endemic. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 47: 170-173, 2003.

53. WHO. **Instructions for the use of the *in vitro* micro-test kit for the assessment of the response of *Plasmodium falciparum* to chloroquine, mefloquine, quinine, amodiaquine, sulfadoxine/pyrimetamine and artemisinin.** Document CTD/MAL/97.20. Geneva. 1997.

54. Desjardins RE, Canfield CJ, Haynes JD, Chulay JD. Quantitative assessment of antimalarial activity *in vitro* by a semiautomated microdilution technique. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 16: 710-718, 1979.

55. Bennett TN, Paguio M, Gligorijevic B, Seudieu C, Kosar AD, Davidson E, Roepe PD. Novel, Rapid, and Inexpensive Cell-Based Quantification of Antimalarial Drug Efficacy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 48 (5): 1807-1810, 2004.

56. Kalra B, Chawla S, Gupta P, Valecha N. Screening of antimalarial drugs: an overview. **Indian Journal of Pharmacology**, 38 (1): 5-12, 2006.

57. Noedl H, Wongsrichanalai C, Wernsdorfer WH, Wongsrichanalai C. Malaria drug-sensitivity testing: new assays, new perspectives. **Trends in Parasitology**, 19: 175-181, 2003.

58. Talisuna AO, Bloland P, D'Alessandro U. History, dynamics and public healthy importance of malaria parasite resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, 17 (1): 235-254, 2004.

59. Makler MT, Hinrichs DJ. Measurement of the lactate dehydrogenase activity of *Plasmodium falciparum* as an assessment of parasitemia. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 48: 205-210, 1993.

60. Druilhe P, Moreno A, Blanc C, Brasseur PH, Jacquier P. A colorimetric *in vitro* drug sensitivity assay for *Plasmodium falciparum* based on a highly sensitive double-site lactate dehydrogenase antigen-capture enzyme-linked immunosorbent assay. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 64 (6): 233-241, 2001.

61. Sherman IW. Heterogeneity of lactic dehydrogenase in avian malaria (*Plasmodium lophurae*). **Journal of Experimental Medicine**, 114: 1049-1062, 1961.

62. Piper R, Le Bras J, Wentworth L, Hunt-Cooke A, Houze S, Chiodini P, Mackler M. Immunocapture diagnostic assays for malaria using *Plasmodium* lactate dehydrogenase (pLDH). **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 6: 109-118, 1999.

63. Basco LK, Marquet F, Makler MM, Le Bras J. *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax:* lactate dehydrogenase activity and its application for *in vitro* drug susceptibility assay. **Experimental Parasitology**, 80: 260-271, 1995.

64. Moreno A, Brasseur PH, Cuzin-Ouattara N, Blanc C, Druilhe P. Evaluation under field conditions of the colourimetric DELI-microtest for the assessment of *Plasmodium falciparum* drug resistance. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 88 (1): 100-103, 2001.

65. Thomas SM, Ndir O, Dieng T, Mboup S, Wypij D, Maguire JH, Wirth DF. *In vitro* chloroquine susceptibility and PCR analysis of *pfcrt* and *pfmdr1* polymorphisms in *Plasmodium falciparum* isolates from Senegal. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 66: 474-480, 2002.

66. De SL, Stanisic D; Rivera F, Batzloff MR, Engwerda C, Good MF. *Plasmodium berghei* bio-burden correlates with parasite lactate dehydrogenase: application to murine *Plasmodium* diagnostics. **Malaria Journal** 15: 3, 2016.

67. Corbett Y, Herrera L, Gonzalez J, Cubilla L, Capson TL, Coley PD. A novel DNA-based microfluorimetric method to evaluate antimalarial drug activity. **Am J Trop Med Hyg**.,70 (2): 119-24, 2004.

68. Dua VK, KAR PK, GUPTA NC, SHARMA VP. Determination of chloroquine and desethylchloroquine in plasma and blood cells of *Plasmodium vivax* malaria cases using liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 21: 199-205, 1999.

69. Wilson DW, Langer C, Goodman CD, McFadden GI, Beeson JG. Defining the Timing of Action of Antimalarial Drugs against *Plasmodium falciparum.* **Antimicrob Agents Chemoter.** 14; 57(3):1455-1467, 2013.

70. Sinha S, Sarma P, Sehgal R, Medhi B. Development in assay methods for in vitro antimalarial drug efficacy testing: a systematic review. **Frontiers in Pharmacology**, 8:754, 2017.

71. Gamboa D, Ho M.-F, Bendezu J, Torres K, Chiodini PL, Barnwell JW, Incardona S, Perkins M, Bell D, McCarthy J, Cheng Q. A Large Proportion of *P. falciparum* Isolates in the Amazon Region of Peru Lack Pfhrp2 and Pfhrp3: Implications for Malaria Rapid Diagnostic Tests. **PloS One** 5, e8091, 2010.

72. Rachid Viana GM, Akinyi Okoth S, Silva-Flannery L, Lima Barbosa DR, Macedo de Oliveira A, Goldman IF, Morton LC, Huber C, Anez A, Dantas Machado RL, Aranha Camargo LM, Negreiros do Valle SC, Marins Póvoa M, Udhayakumar V, Barnwell JW. Histidine-Rich Protein 2 (Pfhrp2) and Pfhrp3 Gene Deletions in *Plasmodium falciparum* Isolates from Select Sites in Brazil and Bolivia. **PloS One** 12, e0171150, 2017.

73. Góes L, Chamma-Siqueira N, Peres JM, Nascimento JM, Valle S, Arcanjo AR, Lacerda M, Blume L, Póvoa M, Viana G. Evaluation of Histidine-Rich Proteins 2 and 3 Gene Deletions in *Plasmodium falciparum* in Endemic Areas of the Brazilian Amazon. **Int. J. Environ. Res. Public Health** 18, 1–9, 2021.

CAPÍTULO V

Artigo a ser submetido a Revista Contexto & Saúde

ATIVIDADE ANTIPLASMÓDICA E CITOTOXICIDADE DE *Carapichea ipecacuanha* (BROT.) L. ANDERSON

Christian Neri Lameira[1], Maria Fani Dolabela[2], Milena Cristina Martins da Silva[2], Edivaldo Herculano[3], Marinete Marins Póvoa[3], Giselle Maria Rachid Viana[3]

RESUMO

Nas raízes da *Carapichea ipecacuanha* são encontradas várias substâncias, como por exemplo, os alcaloides emetina e cefalina, e apesar da presença destes princípios ativos e do uso popular na medicina tradicional no tratamento da malária, nenhum estudo avaliou a atividade antimalárica da espécie. Assim, teve-se por objetivo determinar a atividade antiplasmodial *in vitro* do extrato de *C. ipecacuanha*, sua citotoxicidade e genotoxicidade. Foram avaliados a atividade antiplasmodial de clones de *Plasmodium falciparum* W2 e Dd2, pelo ensaio do microteste, a citotoxicidade através do índice de proliferação celular por bloqueio de citocinese (CBPI) e a genotoxicidade por meio *de bloqueio de citocinese do micronúcleo (BCMN) com células sanguíneas humanas totais. Os resultados demonstraram que os extratos avaliados são ativos ou altamente ativos frente aos clones avaliados, que a citotoxicidade é baixa e que não são genotóxicos. Sugere-se que os extratos brutos das raízes de C. ipecacuanha apresenta atividade antiplasmódica in vitro, não causa danos ao material genético e apresenta baixa citotoxicidade.*

Palavras-chave: *Carapichea ipecacuanha*, *Plasmodium falciparum*, antimalárico, *in vitro*, W2, Dd2.

ANTIPLASMODIC ACTIVITY AND CITOTOXICITY OF *Carapichea ipecacuanha* (BROT.) L ANDERSON

ABSTRACT

Several substances are found in the roots of *Carapichea ipecacuanha*, such as the alkaloids emetine and cephalin, and despite the presence of these active principles and their popular use in traditional medicine to treat the malaria, there is not yet study to evaluate the antimalarial activity of the species. Thus, the objective was to determine the in vitro antiplasmodial activity of the *C. ipecacuanha* extract, its cytotoxicity and genotoxicity. The antiplasmodial activity of clones of the *Plasmodium falciparum* W2 and Dd2 were evaluated using the microtest assay, cytotoxicity using the cytokinesis blocking cell proliferation index (CBPI) and genotoxicity using cytokinesis blocking micronucleus (CBMN) with cells whole human blood. The results demonstrate that the evaluated extracts are active or highly active against the evaluated clones, that the cytotoxicity is low and that they are not genotoxic. It is suggested that the roots extracts of the *C. ipecacuanha* have antimalarial activity, does not cause damage to the genetic material, and has low cytotoxicity.

Keywords: *Carapichea ipecacuanha*, *Plasmodium falciparum*, antimalarial, *in vitro*, W2, Dd2

[1] Autor correspondente: Centro Universitário Fibra. Avenida Gentil Bittencourt, 1144. Bairro Nazaré. Belém-PA CEP: 66040-174. http://lattes.cnpq.br/4714858296808855. http://orcid.org/0000-0003-3126-9072

[2] Universidade Federal do Pará. Belém/PA. Brasil.

[3] Instituto Evandro Chagas. Ananindeua/PA. Brasil

INTRODUÇÃO

A malária é uma doença infecciosa causada por um parasito unicelular do gênero *Plasmodium*, sua transmissão ocorre de forma vetorial através da fêmea do culicídeo do gênero *Anopheles*[1]. Em 2021 aproximadamente 4 bilhões de pessoas estiveram suscetíveis à malária, com registro de 247 milhões de casos e que ocasionaram à morte de 619.000 pessoas, aumento possivelmente associado à desmobilização ou mesmo interrupção dos serviços de combate à doença durante a pandemia da COVID-19[2].

Os componentes relacionados ao diagnóstico oportuno associado ao tratamento eficaz e imediato dos casos detectados representam os pilares das estratégias de controle efetivo da malária. Para a escolha do antimalárico apropriado, deve-se considerar a espécie de plasmódio causador da infecção, faixa etária do paciente, gravidade do quadro clínico, padrão de resistência na área ondea infecção foi adquirida, quimioprofilaxia e tratamento anterior, história de exposição prévia e condições associadas, tais como gravidez e demais circunstâncias de saúde[3].

As observações dos missionários Jesuítas no século XVII, do uso da casca de uma árvore no tratamento de febres por tribos indígenas sul-americanas, levou, posteriormente, a descoberta do quinino, que se manteve como fármaco de eleição para tratamento e prevenção da malária por muito tempo[4]. A década de 60 é relatada como marco inicial à resistência aos fármacos antimaláricos, pois neste período houve o surgimento, de forma independente, da resistência do *Plasmodium falciparum* à cloroquina no final da década de 50 na Colômbia e no Brasil bem como na região de fronteira Tailândia-Camboja, que se expandiu para a África no final dos anos 70 [5].

A já conhecida resistência do *Plasmodium falciparum* à cloroquina e aos derivados do quinino, o aparecimento e detecção de cepas mutantes associadas à resistência do *P. falciparum* à artemisinina (ART) e seus derivados, observados em países da Ásia como Mianmar, Camboja, Vietnã, Tailândia, Laos e na província de Yunnan, na China[6] e recentemente de resistência parcial à artemisinina, com aparente disseminação de mutantes na África,[7] justificam a busca por novos compostos que possam ser utilizados como opção terapêutica.

Classicamente, os alcaloides são os componentes dos espécimes vegetais relacionados à atividade antimalárica. A investigação fitoquímica da Família *Rubiaceae* revelou que os alcaloides indólicos são seus marcadores químicos[8] e os encontrados nas espécies desta família demonstram diversos efeitos farmacológicos, entre eles o antimalárico[9]. Nas raízes da *Carapichea ipecacuanha* (Rubiaceae) são encontradas várias substâncias, como por exemplo, os alcaloides emetina e cefalina, estando relacionados às propriedades terapêuticas da planta[10].

Conforme relatado, apesar da presença de alcaloides nas raízes da *C. ipecacuanha* e de seu uso popular na medicina tradicional no tratamento da malária, até o presente, nenhum estudo avaliou a atividade antiplasmódica desta espécie. Assim, o presente estudo teve por objetivo determinar a atividade antiplasmodial *in vitro* do extrato de *C. ipecacuanha*, assim como sua citotoxicidade e genotoxicidade.

METODOLOGIA

Aspectos éticos e biossegurança

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Instituto Evandro Chagas (CEP/IEC/SVSA/MS), CAAE: 57367321.2.0000.0019 (**ANEXO 3**). Ressalta-se também que todo e qualquer procedimento envolvendo a manipulação de amostras biológicas foi realizado em laboratório de nível de contenção NB2 (Nível de Biossegurança 2), de acordo com as normas de Biossegurança estabelecidas pela Comissão Interna de Biossegurança do Instituto Evandro Chagas (CIBIO/IEC).

Material botânico

Amostras das raízes de *C. ipecacuanha* foram obtidas de coleção cultivada no Horto de Plantas Medicinais da Embrapa Amazônia Oriental, na cidade de Belém, no estado do Pará, situado à 1°27´21´´S de latitude e 48°30´4´´W de longitude, com altitude em torno de 10 metros e temperatura média anual de 30°C. Exsicata da espécie se encontra depositada no Herbário IAN da Embrapa Amazônia Oriental sob registro Nº 197984. O estudo está registrado no SISGEN sob o nº A2C1D3D. As raízes da espécie foram coletadas nos meses de abril e outubro de 2018.

Obtenção dos Extratos

Em cada período avaliado (abril e outubro de 2018), foi coletado em torno de 840g das raízes que, em seguida, foram lavadas e retirado o excesso de água com papel toalha. Em seguida, foram fragmentadas e levadas à estufa de secagem à temperatura de 60 ºC. O material foi pesado a cada 2 horas, atéque o peso se tornasse constante, obtendo-se 154g ao final do processo. Posteriormente, o material foi triturado e passado no tamis, até a obtenção de pó.

Pesou-se 100g do pó, transferiu-se para frasco âmbar e adicionou-se 1.000 mL de solução hidroalcoólica a 70%. O macerado foi mantido à temperatura ambiente (em torno de 20 e 25 ºC) por 10 dias, protegido da luz direta e da umidade relativa do ar. Ao final, todo o macerado foi filtrado, obtendo-se 760 mL de extrato de cada amostra.

Clones de referência

Cultura de *P. falciparum* referente aos clones padrões W2/Indochina (resistente à Cloroquina e sensível à Mefloquina; gentilmente fornecido por Dennis Kyle do Instituto de Pesquisas Walter Reed Army - WRAIR, Departamento de Terapia Experimental, Silver Spring, MD) e Dd2 (resistente à Cloroquina, Mefloquina e Quinino, procedente da Indochina) foram empregados nos ensaios *in vitro* para avaliação da atividade antiplasmódica.

Atividade antiplasmódica *in vitro*

O cultivo do *P. falciparum* clones W2/Indochina e Dd2 foi realizado de acordo com Trager & Jensen (1976)[11]. Quando a densidade parasitária atingiu 6 % ou mais, apresentando múltiplas formas (trofozoítos jovens e esquizontes) do parasito, com maior predomínio de formas jovens (trofozoítos – aneis), o cultivo foi sincronizado com solução de sorbitol: glicose (LAMBROS & VANDERBERG, 1979)[12], para que, após a sincronização, o ensaio fosse realizado Distensões sanguíneas (DS) foram preparadas e fixadas com metanol e corados com solução diluída de Giemsa. Após 10 minutos, as lâminas foram lavadas em água corrente, secas ao ar e posteriormente examinadas ao microscópio óptico com objetiva de imersão (100x). Os percentuais das densidades parasitárias foram verificados pela contagem do número de hemácias totais infectadas. Através da estimativa para contagem do número total de hemácias infectadas por campo microscópico, e a partir desta, calculou-se o número de campos a serem contados.

Posteriormente, utilizou-se o método tradicional do microteste descrito por Rieckmann *et al*. (1978) e modificado por Carvalho *et al*. (1991)[14]. No ensaio, foram utilizados os seguintes controles: 1. Controle negativo: sem substância e sem solvente, sendo sua densidade parasitária considerada o 100% experimental; 2. Controle do solvente: onde a densidade parasitária deve ser igual a 0%; 3. Controle positivo: com utilização da droga antimalárica (Cloroquina) em diferentes concentrações (0,1mg/mL, 0,05 mg/mL, 0,025 mg/mL, 0,0125 mg/mL, 0,00625 mg/mL, 0,003125 mg/mL e 0,0015625 mg/mL).

Cultivos sincronizados de cada clone analisado, contendo, predominantemente, trofozoítos (>90%), foram diluídos para densidade parasitária de 1% e o hematócrito ajustado para 5% e, em seguida, distribuídos em três placas contendo: placa 1 com o controle negativo,

controle do solvente e a amostra 1 (extrato 1 – EBCIIA) em diferentes concentrações (2mg/mL, 1 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,125 mg/mL, 0,0625 mg/mL e 0,03125 mg/mL); placa 2 com o controle negativo, do solvente e a amostra 2 (extrato 2 - EBCIVA) em concentrações semelhantes ao da amostra 1; além da placa 3 com o controle negativo, o do solvente e o controle positivo (cloroquina) em concentrações diversas. Em seguida, com as placas dentro de um dessecador, um para cada clone, adicionou-se a mistura de gases (90% de N2, 5% de CO2 e 5% de O2), por 30 segundos. Em seguida, levou-se as amostras para estufa de incubação a 36 ºC por 23 horas.

Após às primeiras 23 horas, as placas foram inclinadas em um ângulo de 45º, para que os parasitos ficassem depositados em um único ponto do poço, após 1 hora, retirou-se o meio e transferiu-se os parasitos para novo poço subsequente, na mesma placa e com a mesma concentração inicial. Logo, foi adicionado meio completo e as placas de cada clone, levadas novamente ao mesmo dessecador inicial, adicionado a mistura de gases (90% de N2, 5% de CO2 e 5% de O2), por 30 segundos e, em seguida, incubadas a 36 ºC novamente por 23 horas.

Passadas mais 23 horas, todo o procedimento descrito anteriormente foi repetido e as amostras novamente incubadas pelo mesmo período. Após outro ciclo de 23 horas adicionais, as placas foram inclinadas e após 1 hora, o meio foi novamente retirado. A partir das amostras depositadas nos poços, foram confeccionadas as DS para posterior leitura e determinação da densidade parasitária percentual e para posterior cálculo da Concentração Inibitória 50% (CI50), concentração necessária para reduzir em 50% o crescimento de células viáveis. Para isto, utilizou-se o programa GraphPad Prism 9.4.1.

A partir da avaliação da atividade antiplasmódica e com a obtenção dos resultados de CI50, categorizou-se as amostras de acordo com o padrão de classificação para extratos vegetais adotados por Paula *et al*. (2019), conforme quadro 1[15].

Quadro 1. Classificação das amostras analisadas, em consonância aos resultados da CI_{50} para atividade antiplasmódica.

CI50 µg/mL	Resultado
< 1	Muito ativo
≥ 1 e ≤ 15	Ativo
> 15 e ≤ 25	Moderadamente ativo
> 25 e ≤ 50	Pouco ativo
> 50	Inativo

Fonte: adaptado de Paula *et al*. (2019)

Cálculo do índice de proliferação celular por bloqueio de citocinese (CBPI)

O ensaio de citotoxicidade visa estabelecer o grau de viabilidade celular após o tratamento com

nitroimidazóis para definir as faixas de concentração da amostra (CA) a serem testadas no ensaio *in vitro*[16].

O cálculo do CBPI (*Cytokinesis-Block Proliferation Index*) indica os efeitos citotóxicos decorrentes da exposição a diferentes concentrações de um agente químico avaliados, levando em consideração a diminuição ou não do índice de proliferação celular. A partir dos valores obtidos, pode-se derivar também o índice de replicação (RI) e a citostase (parada de divisão celular. O CBPI foi realizado com culturas de sangue total seguindo a diretriz 487 da OECD (2016)[17], com modificações. Amostras de sangue total foram obtidas por punção venosa de voluntários, em frasco heparinizado, e utilizadas para cultura de linfócitos de sangue total. Em tubos de cultura de 15 mL, 0,5 mL de sangue recém-coletado foram adicionados a 4,5 mL de Meio RPMI 1640 (Gibco, EUA) suplementado com 10% FBS (Gibco, EUA), 102 UI/mL penicilina G potássica, 102 µg/mL sulfato de estreptomicina, 3% fitohemaglutinina M (PHA-M: Gibco, EUA) e incubado a 37ºC. Após 24 horas, o extrato a ser testado foi adicionado. Utilizou-se uma solução de 2 mg/ml em DMSO, em quantidades que resultassem nas duas concentrações finais escolhidas para o teste: 0,03125 mg/ml e 0,0625 mg/ml. Além disso, um frasco recebeu o veículo (150 µl de DMSO), um controle positivo (150 µl de solução de colcemid), enquanto um frasco foi mantido somente com o meio completo e o sangue, que seria o controle negativo. Em todas as garrafas, foram adicionados 4,5 µg/mL de citocalasina B (CytB) (Sigma-Aldrich) e incubados a 37ºC por 48 horas. CytB tem atividade de bloqueio de citocinese levando à formação de células binucleadas.

As culturas foram colhidas ao final de um tempo total de cultivo de 72 h por centrifugação e tratado com 5 mL de solução hipotônica (0,56% KCl, 4-6ºC) por 10 min e fixado uma vez por 10 min em temperatura ambiente com 5 mL de metanol/ácido acético glacial (3 :1, -20ºC). A suspensão de células fixadas foi gotejada em uma lâmina de vidro limpa e após secas ao ar, foram coradas com solução de Giemsa 5% em tampão Sörensen (0,03 M KH2PO4, 0,03 M Na2HPO4) por 5 minutos. depois foram embebidas em água destilada e cobertas com uma lamínula, e analisadas em microscópio de campo claro, com objetiva de 40x.

O índice de proliferação de blocos de citocinese (CBPI) e o índice de replicação (IR) foram calculados a partir de 100 células por tratamento. O CBPI indica o número médio de núcleos por célula e pode ser usado para calcular a proliferação celular. O IR indica o número relativo de ciclos celulares por célula durante o período de exposição a cytoB em culturas tratadas em comparação com culturas de controle e pode ser usado para calcular a % de citostase. As fórmulas para cálculo do CBPI e do IR (%) foi calculado de acordo com as fórmulas no Quadro 2 a seguir:

Quadro 2. Cálculo de CPBI e do IR

Cálculo de CPBI (Cytokinesis-Block Proliferation Index):

$$\textbf{CBPI} = \frac{((\text{No. mononucleate cells}) + (2 \times \text{No. binucleate cells}) + (3 \times \text{No. multinucleate cells}))}{(\text{Total number of cells})}$$

Onde:
T = test chemical treatment culture
C = control culture

Cálculo do IR (Replication Index)

$$\textbf{IR (\%)} = \frac{((\text{No. binucleate cells}) + (2 \times \text{No. multinucleate cells})) \div (\text{Total number of cells})_T}{((\text{No. binucleate cells}) + (2 \times \text{No. multinucleate cells})) \div (\text{Total number of cells})_C} \times 100$$

Observação:
Citostase %= 100-IR

Ensaio in vitro de bloqueio de citocinese do micronúcleo (BCMN) com células sanguíneas humanas totais

As propriedades genotóxicas dos extratos analisados foram verificadas pelo teste do micronúcleo (MN) e o de aberrações cromossômicas. A análise da presença de MN foi feita em lâminas preparadas a partir do material preparado pela técnica de CBPI. Foram considerados os seguintes parâmetros em 100 células: a presença ou ausência de MN, de pontes citoplasmáticas, ou de alterações morfológicas nos núcleos.

Em relação ao teste de aberrações cromossômicas, 0,5 ml de sangue heparinizado foram adicionados a tubos de cultura de 15 mL, contendo 4,5 mL de Meio RPMI 1640 (Gibco, EUA) suplementado com 10% FBS (Gibco, EUA), 102 UI/mL penicilina G potássica, 102 µg/mL sulfato de estreptomicina, 3% fitohemaglutinina M (PHA-M: Gibco, EUA) e incubado a 37ºC. Após 24 horas, o extrato a ser testado foi adicionado. Utilizou-se uma solução de 2 mg/ml em DMSO, em quantidades que resultassem nas duas concentrações finais escolhidas para o teste: 0,03125 mg/ml e 0,0625 mg/ml. Além disso, um frasco recebeu o veículo (150 µl de DMSO), enquanto um frasco foi mantido somente com o meio completo e o sangue, que seria o controle negativo. Após completarem-se 71 horas de tempo total de cultura, cada garrafa recebeu 150 µl de colcemid, para bloqueio metafásico.

As culturas foram colhidas ao final de um tempo total de cultivo de 72 h por centrifugação e tratado com 5 mL de solução hipotônica (0,56% KCl, 4-6ºC) por 30 min e fixado uma vez por 10 min em temperatura ambiente com 5 mL de metanol/ácido acético glacial (3 :1, -20ºC). Após três lavagens com fixador (centrifugação, retirada de sobrenadante e ressuspensão em novo fixador), a suspensão de células foi gotejada em uma lâmina de vidro

limpa. As lâminas secas ao ar foram coradas com solução de Giemsa 5% em tampão Sörensen (0,03 M KH2PO4, 0,03 M Na2HPO4) por 5 minutos. As lâminas foram analisadas em microscópio (100x). Em 50 metáfases por tratamento, foram analisados os seguintes parâmetros: número de cromossomos, presença de gaps, presença de cromossomos dicêntricos e presença de figuras radiais[18].

Análise estatística

Os dados foram analisados qualitativamente a partir do uso do teste binomial para duas proporções, teste do X^2, teste G de Williams para comparação das frequências e proporções entre os diferentes tratamentos, considerando significante $p<0.05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Atividade antiplasmódica

Para avaliação da atividade antiplasmódica, foram utilizados os extratos hidroalcóolicos brutos obtidos das raízes de *C. ipecacunha* coletados nos meses de abril, durante o inverno Amazônico (extrato 1 – EBCIIA) e em outubro, durante o verão Amazônico (extrato 2 - EBCIVA), avaliados sobre os clones de *P. falciparum* W2 e Dd2. O extrato 1 apresentou uma CI_{50} igual a 2,55 µg/mL para o clone W2, já para o clone Dd2 a CI_{50} não pode ser mensurável, considerando as análises do programa estatístico empregado. O extrato 2 apresentou CI_{50} igual a 0,5 µg/mL para o clone Dd2 e a CI_{50} para o clone W2 também não pode ser mensurável pelo programa estatístico (Tabela 1). A atividade antimalárica da Família Rubiaceae está associada a presença dos alcaloides[19], no caso da *C. ipecacuanha* está relacionada aos alcaloides emetina e cefalina, metabólitos presentes em maior concentração na composição química da planta[20].

Tabela 1. Concentração inibitória de 50% (CI_{50}) do crescimento dos clones W2 e Dd2 de *P. falciparum* dos extratos brutos das raízes de *C. ipecacuanha*, obtidos durante os períodos do inverno e do verão Amazônico.

Extrato	CI_{50} (µg/mL) em clones de *P. falciparum*			
	W2	Atividade	Dd2	Atividade
1 – EBCIIA	2,55	Ativo	-	-
2 – EBCIVA	-	-	0,5	Muito ativo
CQ	4,9	Ativo	4,9	Ativo

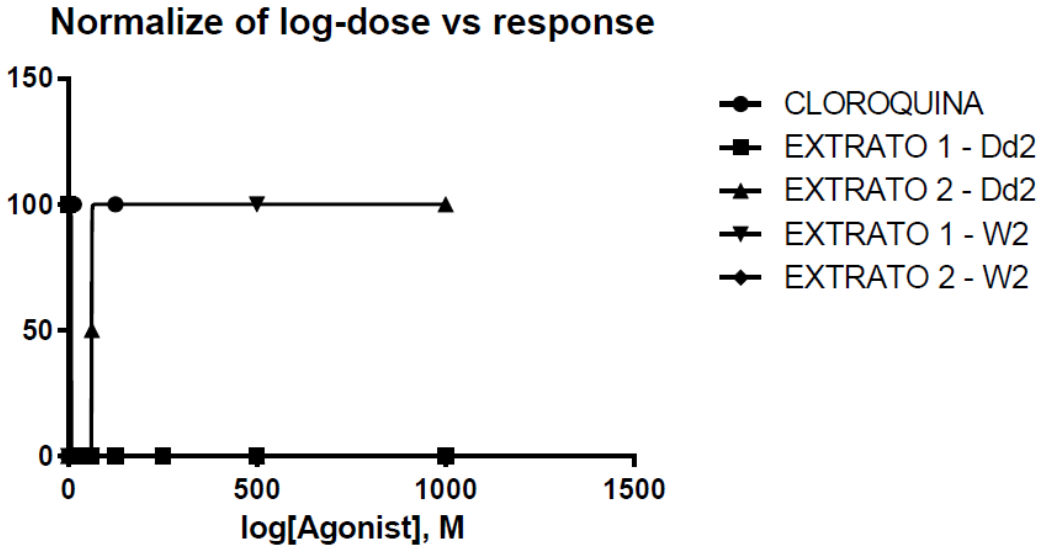
Legenda: EBCIIA: extrato hidroalcóolico bruto proveniente das raízes de *C. ipecacuanha* obtido durante o inverno Amazônico; EBCIVA: extrato hidroalcóolico bruto proveniente das raízes de *C. ipecacuanha* obtido durante o verão Amazônico; CQ: cloroquina, droga padrão utilizada no teste por recomendação da OMS (Organização Mundial de Saúde).

Como observado, a atividade biológica de *C. ipecacuanha* está provavelmente associada à condição de obtenção dos extratos, ou seja, ao período de coleta das amostras, período de maior ou menor precipitação pluviométrica. Esta condição possibilitou à observação de atividade distinta para os clones utilizados no experimento, sendo ativos ou muito ativos. Assim, há de se considerar que o período de coleta da amostra vegetal poderá contribuir de forma mais significativa na resposta terapêutica.

Os resultados deste estudo são superiores aos observados por Chaniad *et al*. (2022), que ao avaliarem a atividade antiplasmodial e citotóxica de extratos vegetais da Família Rubiaceae, consideraram como muitos ativos aqueles com IC_{50} < 10 µg/mL[19], diferentemente do observado neste estudo, onde o extrato 1 (EBCIIA) foi ativo (IC_{50} = 2,55 µg/mL) para o clone W2 de *P. falciparum* e o extrato 2 (EBCIVA) muito ativo (IC_{50} = 0,5 µg/mL) para o clone Dd2 de *P. falciparum*. Ainda, a atividade dos extratos foi superior ao da droga padrão (IC_{50} = 4,9 µg/mL).

A análise gráfica das concentrações dos extratos *versus* a resposta, está representado na figura 1, onde se observa que as concentrações de cloroquina, do extrato 1 para W2 e do extrato 2 para Dd2 apresentaram elevada atividade antiplasmódica.

Figura 1. Gráfico ilustrativo da correlação entre dose *versus* resposta na atividade antiplasmódica dos extratos 1 e 2 de *C. ipecacuanha* e da cloroquina frente aos clones W2 e Dd2 de *P. falciparum*.



Para Uzor (2020), a presença de alcaloides, flavonoides e de terpenos, é condição básica para que uma espécie possa ter atividade antimalárica[21]. Os alcaloides indólicos emetina e cefalina são os compostos majoritários da espécie *C. ipecacuanha* e considerados os seus marcadores taxonômicos[8]. Entretanto, a composição química de uma espécie, em especial a quantitativa, está associada a fatores inerentes ou não à planta, como mudanças fisiológicas,

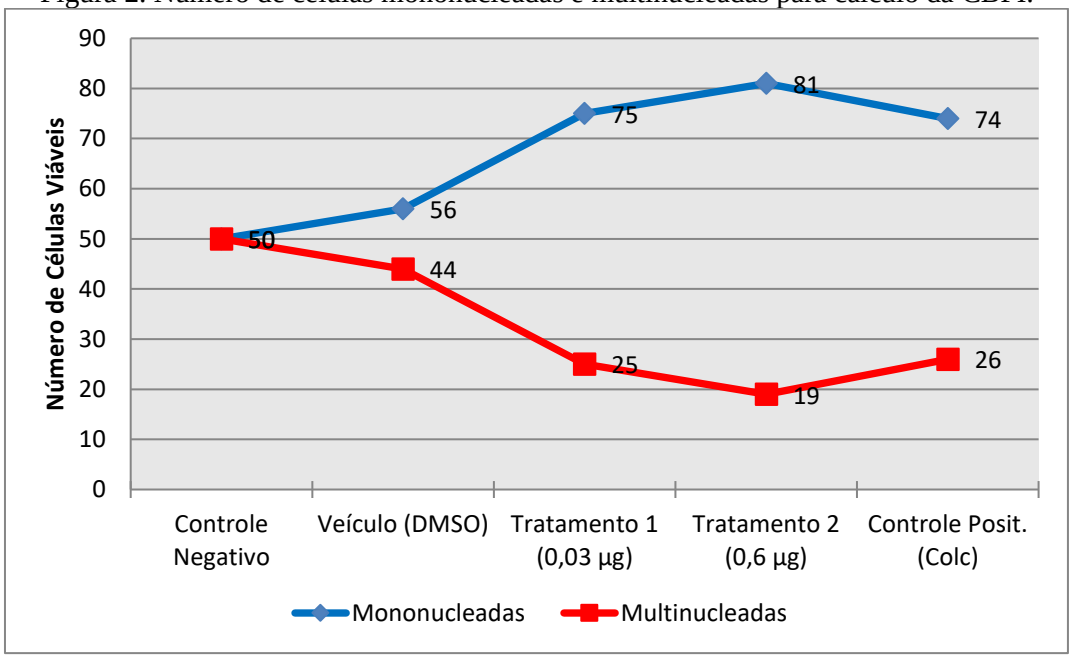
atividades metabólicas específicas, pluviosidade, temperatura, ciclo circadiano, entre outros[22], contexto que poderia explicar a diferença na resposta antiplasmódica dos extratos 1 e 2 frente aos clones W2 e Dd2 de *P. falciparum*.

Desse modo, demonstrou-se que a atividade biológica *in vitro* de *C. ipecacuanha* provavelmente está relacionada ao período de coleta das suas raízes, pois observou-se níveis de atividade antiplasmódica distinta entre os extratos analisados frente aos clones W2 e Dd2 de *P. falciparum*. Ademais, pode-se também considerar que o uso etnobotânico da espécie *C. ipecacuanha* pelas comunidades tradicionais para tratamento de quadros febris, dentre estes a malária, por meio da decocção das raízes desta planta[23] apresenta evidência científica, uma vez que a atividade antiplasmódica foi demonstrada neste estudo.

Cálculo do índice de proliferação celular por bloqueio de citocinese (CBPI)

O número de células mononucleadas e multinucleadas utilizadas para cálculo da CBPI está representada na Figura 2.

Figura 2. Número de células mononucleadas e multinucleadas para cálculo da CBPI.

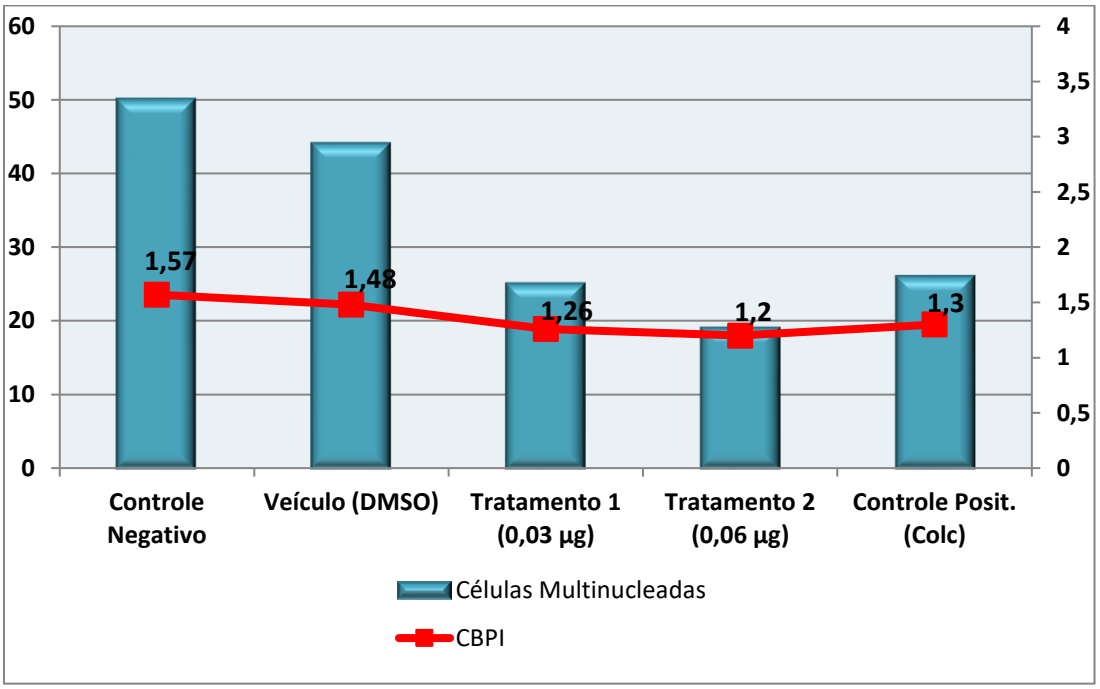


Nossos resultados demonstraram (figura 3) que o veículo (DMSO) apresentou um valor de CBPI (1,48) com diferença não significante estatisticamente quando comparado com o controle negativo. Já a colchicina (controle positivo) produziu uma grande diminuição no CBPI (1,3), em comparação com o controle negativo (1,57). Da mesma forma, os dois tratamentos apresentaram diminuição significativa nos valores do CBPI.

Esses cálculos levam em conta a percentagem de células binucleadas em cada um dos tratamentos. Em estudo que investigou a atividade citotóxica de agentes tripanocidas, observou-se que a CBPI dos controles negativos foi superior ao do controle do solvente e dos tratamentos, o que confere

o aumento da citotoxidade[18]. Entretanto, no presente estudo, apesar de haver uma diminuição dos valores da CPBI para o tratamento 1 (1,26) e tratamento 2 (1,2), sem que houvesse diferença estatisticamente significante entre eles, os valores do CBPI são maiores que os observados por Trompowsky *et al*. (2019)[18]. Os tratamentos utilizados conferem baixo índice de proliferação celular, conferindo aos extratos baixa citotoxicidade.

Figura 3. Quantidade de células multinucleadas e seus respectivos CBPI.



A expressão dos resultados é de grande valia, pois a maioria dos estudos relacionados à espécie *C. ipecacuanha* está associada as suas propriedades farmacológicas, e em especial às frações do extrato e não ao extrato bruto obtido em diferentes estações do ano. Estes achados corroboram com o observado por Falanga *et al*. (2022), que ao analisarem a atividade de três frações do extrato das raízes da espécie *C. ipecacuanha*, determinaram que estes não apresentaram efeito citotóxico[24].

Em relação ao índice de replicação (RI), também tivemos um reflexo dos valores do CBPI, com menores percentagens de replicação nas células tratadas e no controle positivo. No quadro 3, estes índices estão representados, além dos valores da citostase.

Quadro 3. Índice da CBPI, da citostase e da RI.

	CBPI	RI%	Citostase (100-RI)
Controle Negativo	1,57	------	
Veículo (DMSO)	1,48	84,21	15,79
Tratamento 1 (0,03 µg)	1,26	45,61	54,39
Tratamento 2 (0,06 µg)	1,20	35,08	64,92
Controle Posit. (Colc)	1,30	52,63	47,37

Legenda: DMSO – dimetilsulfóxido; Colc – colchicina.

A emergência e disseminação de resistência a grande parte dos esquemas terapêuticos disponíveis, em especial os relacionados à espécie *P. falciparum*, impulsionou a busca por alternativas terapêuticas para mitigar este cenário, sendo as plantas importantes fontes de fármacos antimaláricos, sobretudo, os espécimes vegetais ricos em alcaloides. Pesquisas têm sido realizadas com intuito de fornecer subsídios para descoberta de possíveis agentes antimaláricos. Entretanto, determinar somente a atividade antiplasmódica não é suficiente, pois é fundamental avaliar também os parâmetros de citotoxicidade e genotoxicidade[25] na pesquisa de novos agentes antimaláricos de uso etnobotânico, no intuito de garantir a segurança do fármaco. Estes ensaios para determinação dos parâmetros de segurança farmacológica vêm sendo empregados em outras investigações, como observado no estudo da atividade antiplasmodial e citotóxica realizado com a espécie *Polyalthia longifolia*, em que esta espécie apresentou baixa citotoxicidade e boa atividade antiplasmódica[26].

Os resultados do presente estudo demonstraram que todos os tratamentos avaliados apresentaram valores de RI inferiores a 55%, conforme recomendado pela OECD[17], e considerando os resultados obtidos para a citostase, há de se considerar o potencial dos extratos na investigação em linhagens de células cancerígenas.

Testes de Genotoxicidade

Um dos testes mais utilizados na avaliação dos danos genotóxicos é o ensaio do micronúcleo (MN), uma vez que agentes genotóxicos são capazes de interagir com o DNA podendo provocar alterações na sua estrutura e função[17]. Em nenhum dos tratamentos utilizados houve a produção de MN, nem alterações morfológicas no núcleo. Adicionalmente, as metáfases analisadas em todos os tratamentos apresentaram número e morfologia cromossômica normais, indicando que as concentrações utilizadas não apresentaram propriedades genotóxicas.

A utilização de plantas medicinais por comunidades tradicionais deve ser avaliada de modo mais criterioso, pois o uso inadequado ou incorreto pode levar ao desenvolvimento de outras patologias ou mesmo quadros de intoxicações. Como observado por Nakaganda *et al*. (2021), na pesquisa sobre o uso popular de *Plectranthus hadiensis* (Lamiaceae) por jovens (faixa etária de 12 a 18 anos) oriundos de Uganda, que costumavam utilizar esta planta com a finalidade de aumentar a fertilidade. Entretanto,

observou-se nestas jovens que faziam uso da referida planta, associação de causa-efeito entre o uso frequente da espécie e o surgimento de grandes massas mamárias[27]. Por outro lado, estudo que avaliou a atividade antiplasmódica de *P. hadiensis*, sua citotoxicidade e genotoxicidade, demonstrou que a espécie apresentava pouca atividade antiplasmódica, baixa citotoxicidade e não era mutagênica[28].

As avaliações genotóxicas e citotóxicas *in vitro* podem garantir minimamente a segurança no uso de uma planta para fins medicinais. Não obstante, estas análises também podem determinar se uma planta medicinal de uso tradicional pode conferir propriedades tóxicas aos usuários da espécie. Contudo, deve-se ressaltar que o percurso para que qualquer componente de origem vegetal venha a constituir um fármaco com ação antimalárica comprovada é sistemático, contemplando resumidamente os princípios norteadores a seguir: 1- o componente selecionado deve apresentar atividade antiplasmódica tanto frente a clones de referência da espécie *P. falciparum* resistentes como sensíveis à Cloroquina, 2- este componente deve demonstrar ação seletivamente tóxica às espécies de *Plasmodium* sp., 3- o componente deve ser capaz de destruir e eliminar os plasmódios em camundongos (*in vivo*), apresentando atividade antiplasmódica e ausência de toxicidade, e 4- a atividade farmacológica do componente deve ser comprovada também pela via de administração oral[29].

Quanto às principais limitações do estudo, deve-se considerar que não foi possível incluir nos ensaios *in vitro* outros clones de referência do *P. falciparum*, a título de exemplo dos 7G8 (*P. falciparum* resistente à Cloroquina procedente do Brasil), HB3 (*P. falciparum* sensível à Cloroquina, Mefloquina e Quinino, procedente de Honduras) e 3D7 (*P. falciparum* sensível à Cloroquina, Quinino e Mefloquina; clone padrão ATCC/MR4). Afora isto, os resultados obtidos em relação à atividade antiplasmódica dos dois extratos analisados foram oriundos de clones distintos do *P. falciparum*.

Porém, em que pese essas limitações, este estudo é pioneiro em avaliar a atividade antimalárica e a toxicidade dos extratos brutos da espécie *C. ipecacuanha*, a partir da coleta das raízes desta planta em estações climáticas diferentes, ampliando o conhecimento técnico-científico, principalmente, no âmbito da etnobotânica, com vistas à síntese de novos princípios ativos a partir de protótipos vegetais oriundos da diversidade da flora encontrada no bioma brasileiro, em especial, da região Amazônica.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos sugerem que os extratos brutos das raízes de *C. ipecacuanha* são candidatos potenciais a agentes antimaláricos, pois demonstraram atividade antiplasmódica, apresentaram baixa citotoxicidade e foram desprovidos de genotoxicidade.

A priori, deve-se possivelmente considerar que o período de precipitação pluviométrica interfere na atividade antiplasmodial, sendo ativo no período de maior precipitação pluviométrica e muito ativo no período de menor precipitação pluviométrica, para as cepas de *P. falciparum* W2 e Dd2, respectivamente.

Deste modo, o presente estudo sugere que o uso popular da *C. ipecacuanha* na medicina tradicional no tratamento da malária apresentou evidência científica de atividade antiplasmódica por meio de ensaios *in vitro*.

Agradecimentos: Agradecemos aos técnicos Gladison das Chagas Ribeiro, José Maria de Souza Nascimento, José Mário Veloso Peres e Rogério Gomes Brandão pela assistência técnica na realização dos ensaios *in vitro* para determinação da atividade antiplasmódica.

REFERÊNCIAS

[1] BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Imunização e Doenças Transmissíveis. **Guia de tratamento da malária no Brasil.** 2ª ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2021.

[2] World Health Organization. **World Malaria Report 2022.** Geneva: World Health Organization, 2022.

[3] World Health Organization. **Guidelines for the treatment of malaria.** Geneve, 2021.

[4] Siqueira A, Marchesini P, Torres RM, Rodovalho S, Chaves T. **Malária na atenção primária à saúde.** Edição revisada e ampliada. Belo Horizonte: Nescon/UFMG, 2020.

[5] Sá IM de. A resistência à cloroquina e a busca de antimalariais entre as décadas de1960 e 1980. **Hist. Cienc. Saúde–Manguinhos.** 2011 Jul 29;18(2):407-430. DOI: 10.1590/S0104-59702011000200008.

[6] Siddiqui FA, Liang X, Cui L, Plasmodium falciparum resistance to ACTs: emergence, mechanisms, and outlook. **Int J Parasitol Drugs Resist.** 2021 May 26; 16:102-118. DOI: 10.1016/j.ijpddr.2021.05.007.

[7] Balikagala B, Fukuda N, Ikeda M, Katuro OT, Tachibana S-I, Yamauchi M, Opio W, Emoto S, Anywar DA, Kimura E, Palacpac NMQ, Odongo-Aginya EI, Ogwang M, Horii T, Mita T. Evidence of artemisinin-resistant malaria in Africa. **N Engl J Med.** 2021 Sep 23; 385:1163-1171. DOI: 10.1056/NEJMoa2101746.

[8] Formagio ASN, Volobuff CRF, Pereira ZV, Vilela LO, Vilegas W. **Coletânea científica de espécies de *Psychotria ipecacuanha* (Rubiaceae): florística e aspectos químicos e farmacológicos.** Ponta Grossa: Atena, 2021.

[9] Haudecoeur R, Peuchmaura M, Pérèsa B, Rome M, Taïwe GS, Boumendjela A, Boucherle B. Traditional uses, phytochemistry and pharmacological properties of African Nauclea species: A review. **J Ethnopharmacol.** 2018 Feb 15; 212:106-136. DOI: 10.1016/j.jep.2017.10.011.

[10] López MCR, Muñoz-Arrieta R, Abdelnour-Esquivel A. Emetine and cephaeline content in plants of *Psychotria ipecacuanha* in Costa Rica. **Rev. Colomb. Quím.** 2020 May; 49:18-22. DOI: 10.15446/rev.colomb.quim.v49n2.78347.

[11] Trager W, Jensen JB. Human malaria parasites in continuous culture. **Science.** 1976 Aug 20;193(4254):673-675. DOI: 10.1126/science.781840.

[12] Lambros C, Vanderberg JP. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. **J. Parasitol.** 1979;65(3):418-420. PMID: 38936.

[13] Rieckman KH, Sax LJ, Campbell GH, Mrena JF. Drug sensitivity of *Plasmodium falciparum*. An *in vitro* microtechnique. **The Lancet.** 1978 Jan 7;1(8054):22-23. DOI: 10.1016/s0140-6736(78)90365-3.

[14] Carvalho LH, Brandão MG, Santos-Filho D, Lopes JL, Krettli AU. Antimalarial activity of crude extracts from Brazilian plants studied *in vivo* in *Plasmodium berghei*-infected mice and *in vitro* against *Plasmodium falciparum* in culture. **Braz J Med Biol Res.** 1991;24(11):1113-1123. PMID: 1823001.

[15] Paula RC da, Silva SM da, Faria KF, Frézard F, Moreira CP de S, Foubert K, Lopes JCD, Campana PRV, Rocha MP, Silva AF, Silva CG, Pietres LUC, Almeida VL. *In vitro* antileishmanial activity of leaf and stem extracts of seven Brazilian plant species. **J Ethnophamacol.** 2019 Mar 25; 232:155-164. DOI: 10.1016/j.jep.2018.12.026.

[16] Carvalho AS, Salomão K, de Castro SL, Conde TR, Zamith HPS, Caffarena ER. Megazol and its bioisostere 4H-1,2,4-triazole comparing the trypanocidal, cytotoxic and genotoxic activities and their *in vitro* and *in silico* interactions with the *Trypanosoma brucei* nitroreductase

enzyme. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2014 Jun. 27;109(3):315-323. DOI: 10.1590/0074-0276140497.

[17] OECD – Organization for Economic Cooperation and Development. **OECD Guideline for the testing of chemicals. 487: in vitro mammalian cell micronucleus test.** 2016. DOI: 10.1787/9789264264861-en.

[18] Trompowsky ACMV, Conde TR, Lemos RC, Quaresma BMCS, Pitombeira MCSR, Carvalho AS de, Boechat N, Salomão K, Castro SL de, Zamith HP da S. In vitro genotoxicity of nitroimidazoles as a tool in the search of new trypanoicidal agents. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 2019 Jun 27;114: e190017. DOI: 10.1590/0074-02760190017.

[19] Chaniad P, Phuwajaroanpong A, Techarang T, Viriyavejakul P, Chukaew A, Punsawad C. Antiplasmodial activity and cytotoxicity of plant extracts from the Asteraceae and Rubiaceae families. **Helyon.** 2022 Jan 24;8(2022):e08848. DOI: 10.1016/j.heliyon.2022. e08848.

[20] Rosales-López MC, Muñoz-Arrieta R, Abdelnour-Esquivel A. Emetine and cephaeline content in plants of *Psychotria ipecacuanha* in Costa Rica. ver. **Colom. Quim**. 2020 Mar 13;49(2):18-22. DOI: 10.15446/rev.colomb.quim.v49n2.78347.

[21] Uzor PF. Alkaloids from plants with antimalarial activity: a review of recent studies. Evid. Based Complement. Alternat. Med. 2020 Feb 12; 2020:8749083. DOI: 10.1155/2020/8749083.

[22] Nataraj K, Prasad D, Raghavendra V. Phytochemical analysis, antioxidant, vitamin c and antibacterial properties of *Morinda citrifolia* – used traditionally in Ayurvedic treatment in India. **Int. J. Recent Sci. Res.** 2019 Jun;10(6):33107-33113. DOI: 10.24327/ijrsr.2019.1006.3607.

[23] Teixeira VA, Coelho MFB, Ming LC. Poaia [*Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stoves]: aspectos da memória cultural dos poaieiros de Cáceres - Mato Grosso, Brasil. **Rev. Bras. Pl. Med.** 2012 Out 02;14(2):335-343. DOI: 10.1590/S1516-05722012000002000013

[24] Falanga CM, Steinborn C, Muratspahić E, Zimmermann-Klemd AM, Winker M, Krenn L, Huber R, Gruber CW, Gründemann C. Ipecac root extracts and isolated circular peptides differentially suppress inflammatory immune response characterized by proliferation,

activation and degranulation capacity of human lymphocytes *in vitro*. **Biomed. Pharmacother.** 2022 Aug 01; 152:113120. DOI: 10.1016/j.biopha.2022.113120.

[25] Santos RS, Santos RX, Marisco G. Avaliação da atividade genotóxica, citotóxica e antimicrobiana da infusão das folhas de *Spondias purpurea* L. **Scient. Plen.** 2017 Mar 5;13(3):1-9. DOI: 10.14808/sci.plena.2017.039901.

[26] Kwansa-Bentum B, Agyeman K, Larbi-Akor J, Anyigba C, Appiah-Opong R. *In Vitro* Assessment of Antiplasmodial Activity and Cytotoxicity of *Polyalthia longifolia* Leaf Extracts on *Plasmodium falciparum* Strain NF54. **Malar Res Treat.** 2019 Jan 21; 2019:6976298. DOI: 10.1155/2019/6976298.

[27] Nakaganda A, Solt K, Kwagonza L, Driscoll D, Kampi R, Orem J. Challenges faced by cancer patients in Uganda: Implications for health systems strengthening in resource limited settings. **J. of Canc. Pol.** 2020 Dec 5; 27:100263. DOI: 10.1016/j.jcpo.2020.100263.

[28] Schultz F, Osuji OF, Nguyen A, Anywar G, Scheel JR, Caljon G, Pieters L, Garbe L-A. Pharmacological Assessment of the Antiprotozoal Activity, Cytotoxicity and Genotoxicity of Medicinal Plants Used in the Treatment of Malaria in the Greater Mpigi Region in Uganda. **Front. Phamacol.** 2021 Jun 30;12:678535. DOI: 10.3389/fphar.2021.678535.

[29] Wright CW. Tradicional antimalarial and development of novel antimalarial drugs. **J Ethnopharmacol.**, 2005 Aug 22;100(1-2):67-71. doi: 10.1016/j.jep.2005.05.012.

CAPÍTULO VI

Artigo a ser submetido à Revista International Journal of Environmental Research and Public Health

PREDICTION OF PHAMACOLOGICAL PROPERTIES OF EMETINE AND CEPHAELINE

Christian Neri Lameira[1], Nathália Nogueira Chamma Siqueira[2], Giselle Maria Rachid Viana[2], Carlos Alberto Marques de Carvalho[3]

ABSTRACT

Plant species are important sources of chemical compounds, which can be useful for the discovery and development of potential therapeutic agents. The species *Carapichea ipecacuanha* has as major compounds the isoquinoline alkaloids, emetine and cephaeline, which are probably responsible for the pharmacological activity of this plant. To define compounds with better druglike properties, *in silico* analyzes of the pharmacokinetic and toxicodynamic properties of molecules with potential pharmacological activity are necessary. The main objective of this study was to carry out a bioinformatics analysis of the physical-chemical, pharmacokinetic and druglikeness properties of the main alkaloids of *C. ipecacuanha*, emetine and cephaeline, based on their chemical structures, considering their isotopic and stereochemical specifications. To favor the identification of a possible mechanism of antimalarial activity related to these compounds, a prediction algorithm of the main macromolecular targets in humans was used, from the probing of a panel with more than three thousand proteins, by homology of domains proteins using a suite of programs from the Swiss Institute of Bioinformatics. Thus, it was found that both emetine and cephaeline potentially had druglike physical-chemical and pharmacokinetic properties, with probable high gastrointestinal absorption in humans (HIA) and ability to cross the blood-brain barrier (BBB). However, regarding the latter, both also seem to serve as a substrate for P-glycoprotein (PGP), an enzyme present in the endothelial cells of brain capillaries capable of pumping molecules back into the blood, limiting their access to the brain. Furthermore, a priori, neither of the two compounds seems to be able to inhibit the main cytochrome P450 enzymes. In a quick prediction of the main potential targets of emetine and cephaeline in the human organism, both showed a significant probability of interaction with G protein-coupled receptors of the A family (rhodopsin-like), especially alpha-1A and alpha-2A, in addition to enzymes such as the putative RBBP9 hydrolase and voltage-gated ion channels. Other analyzes will contribute to predict similar protein domains, for example, in *Plasmodium* sp., with a view to identify potential targets of antimalarial action, thus guiding future *in vitro* analyzes.

Key words: *Carapichea ipecacuanha,* Emetine, Cephaeline, In silico prediction, Pharmacological properties.

---

[1] Centro Universitário Fibra. Belém/PA. Brasil. Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia –Rede Bionorte-Pólo Pará.

[2] Instituto Evandro Chagas. Ananindeua/PA. Brasil

[3] Corresponding author: Universidade do Estado do Pará. Travessa Perebebuí, 2623 (DPAT/UEPA). Marco, Belém/PA – Brasil. CEP: 66095-662. E-mail: carlos.carvalho@uepa.br http://lattes.cnpq.br/8700672339331484.

1. Introduction

Plant species represent a rich source of chemicals compounds, which can be useful as potential therapeutic agents. Rigorous and well-conducted scientific investigation of species traditionally used by the population can significantly contribute to the discovery of new drugs[1].

Carapichea ipecacuanha (Rubiaceae), popularly known as ipeca, poaia (Brazil) or ipecac (USA) is a medicinal species threatened with genetic erosion or extinction, associated, for instance, with its extractive process in recent centuries. Because, to obtain its alkaloids, it is necessary to remove its root to extract the chemical compounds[2]. The major constituents of the plant are the isoquinoline alkaloids, emetine and cephaeline[3], molecules that have a monoterpenoid-tetrahydroisoquinoline skeleton, formed from the condensation of dopamine and secologanine[4], which converge to cephalin and emetina[5].

Emetine and cephaeline have emetic properties, that is, they act directly on the gastric mucosa, causing irritation and may cause vomiting after administration of the plant[6]. It was demonstrated in cell lines of mammals, plants and yeasts, that both alkaloids inhibited the activity and synthesis of proteins, ribosomal and mitochondrial DNA and RNA[7,8]. Emetine has been reported to have significant antiviral activity against dengue virus[9], HIV[10], other RNA and DNA virus[11], amebicide and expectorant[12], anticancer activity in lung and breast cancer cells[13,14] and which may also inhibit the SARS-CoV-2 virus[15].

Cephaeline can be considered a candidate drug for the treatment of patients with chronic obstructive pulmonary disease - COPD[16], in addition to exhibiting efficacy against Zika and Ebola virus and may be better tolerated than other analogous drugs (emetine, for example)[17].

The discovery of a new drug presupposes long development timelines[18]. The use of natural products in antimalarial chemotherapy is significantly increasing[19]. Ethnobotanic studies have shown that patients infected with *Plasmodium* sp. increasingly seek treatment in traditional products, such as *Cinchona sucrubra*[20] or *Sonchus arvensis*[21].

Investigating the use of medicinal species with therapeutic properties is the path to be followed in the discovery of new products with therapeutic activity. In the in vitro and in vivo investigation of *S. arvensis* leaf extract, for instance, it was determined that this species has antiplasmodial, antioxidant, nephroprotective, hepatoprotective and immunomodulatory activities, in addition to presenting low toxicity[22], demonstrating that the traditional use of the species presented scientific evidence regarding the pharmacological activity in vitro and in vivo.

Molecular docking is a computational procedure that aims to establish, among other mechanisms, the characteristics of a biological target and its ligand, so that new drugs can be developed. The technique can be useful in better understanding the bioavailability of drugs[23]. Therefore, the main objective of the present study was to carry out a bioinformatics analysis of the physical-chemical, pharmacokinetic and druglikeness properties of the main alkaloids of *C. ipecacuanha*, emetine and cephaeline, based on their chemical structures, considering their isotopic specifications and stereochemistry.

2. Material and Methods

Chemical notations relative to the structures of emetine (CID 10219) and cephaeline (CID 442195) were retrieved from PubChem[24] in the simplified molecular-input line-entry system (SMILES) format, using its isomeric version (computed from chemical structures containing isotopic and stereochemical information) as follows: CC[C@H]1CN2CCC3=CC(=C(C=C3[C@@H]2C[C@@H]1C[C@@H]4C5=CC(=C(C=C5CCN4)OC)OC)OC)OC and CC[C@H]1CN2CCC3=CC(=C(C=C3[C@@H]2C[C@@H]1C[C@@H]4C5=CC(=C(C=C5CCN4)O)OC)OC)OC, respectively. These chemical notations were the input data for all subsequent predictions.

Bioavailability parameters of these compounds were calculated on SwissADME[25], as well as cytochrome P450 (CYP) inhibition and druglikeness properties. Gastrointestinal absorption and brain penetration predictions were performed using the brain or intestinal estimated permeation (BOILED-Egg) model[26]. Targets were predicted on SwissTargetPrediction[27] selecting the library of proteins from the species *Homo sapiens*, and the top 15 results were used to determine the main target classes of the query molecules.

3. Results

Retrieving of emetine and cephaeline data available on PubChem revealed similar chemical structures, with molecular weights of 480.6 and 466.6 Da and topological polar surface areas of 52.2 and and 63.2 $Å^2$, respectively. As observed, emetine is a pyridoisoquinoline comprising emetam having methoxy substituents at the 6'-, 7'-, 10- and 11-positions, while cephaeline is a pyridoisoquinoline comprising emetam having a hydroxy group at the 6'-position and methoxy substituents at the 7'-, 10- and 11-positions (Figure 1).

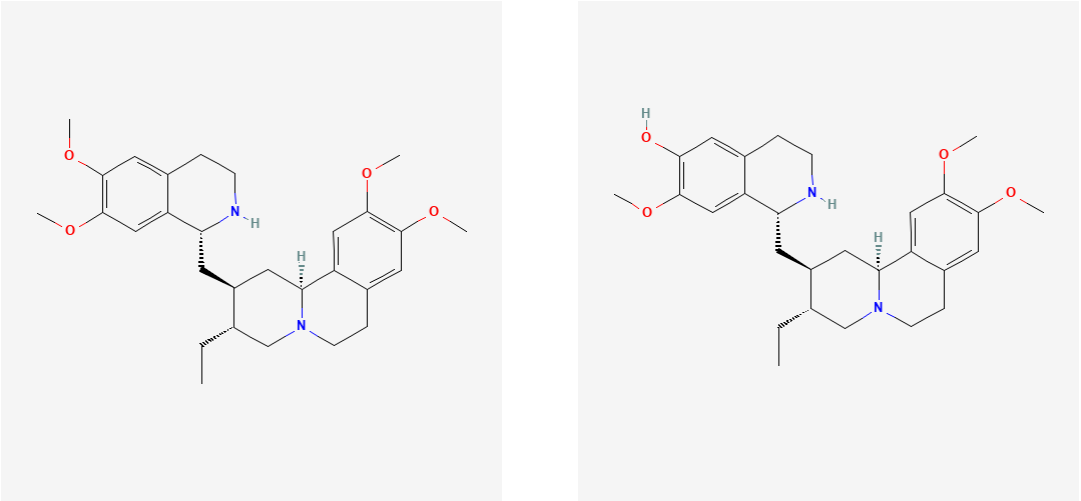


Figure 1: Chemical structures of emetine (left) and cephaeline (right). Depictions were deposited in or calculated by PubChem, with stereochemical orientation communicated as wedges and dashes of perspective formulas. Hydrogen, nitrogen, and oxygen atoms are shown in green, blue, and red, respectively.

On SwissADME, both emetine and cephaeline presented a bioavailability score (probability of F > 10% in rat) of 0.55 and favorable druglikeness according to the Lipinski, Veber, Egan, and Muegge filters, but showed 3 or 2 violations in the Ghose filter, respectively. Also, neither emetine nor cephaeline were indicated as inhibitors of the main CYP isozymes involved in drug metabolism (i.e., CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6, and CYP3A4). As expected, lipophilicity, size, polarity, insolubility, insaturation and flexibility were similar for both compounds, with slightly higher scores of lipophilicities, size, insolubility, and flexibility for emetine and slightly higher scores of polarities and insaturation for cephaeline (Figure 2).

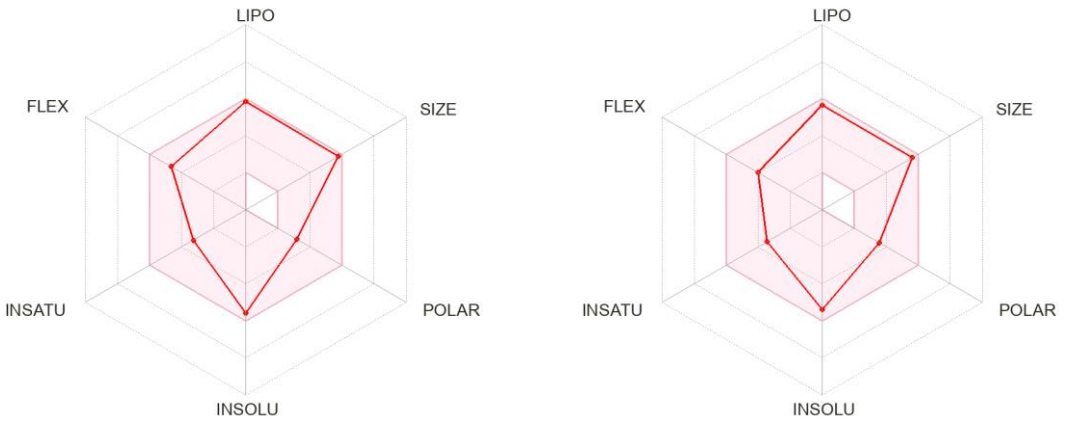


Figure 2: Bioavailability radar of emetine (left) and cephaeline (right). Lipophilicity (LIPO), size (SIZE), polarity (POLAR), insolubility (INSOLU), insaturation (INSATU) and flexibility (FLEX) were calculated on SwissADME. The colored zone is the suitable physicochemical space for oral bioavailability.

Regarding human intestinal absorption (HIA) and blood-brain barrier (BBB) transposition, emetine and cephaeline showed equivalent abilities, with both serving as substrates of the P-glycoprotein (PGP), hindering their permanence in the central nervous system (CNS) after reaching it, as predicted by the BOILED-Egg model (Figure 3).

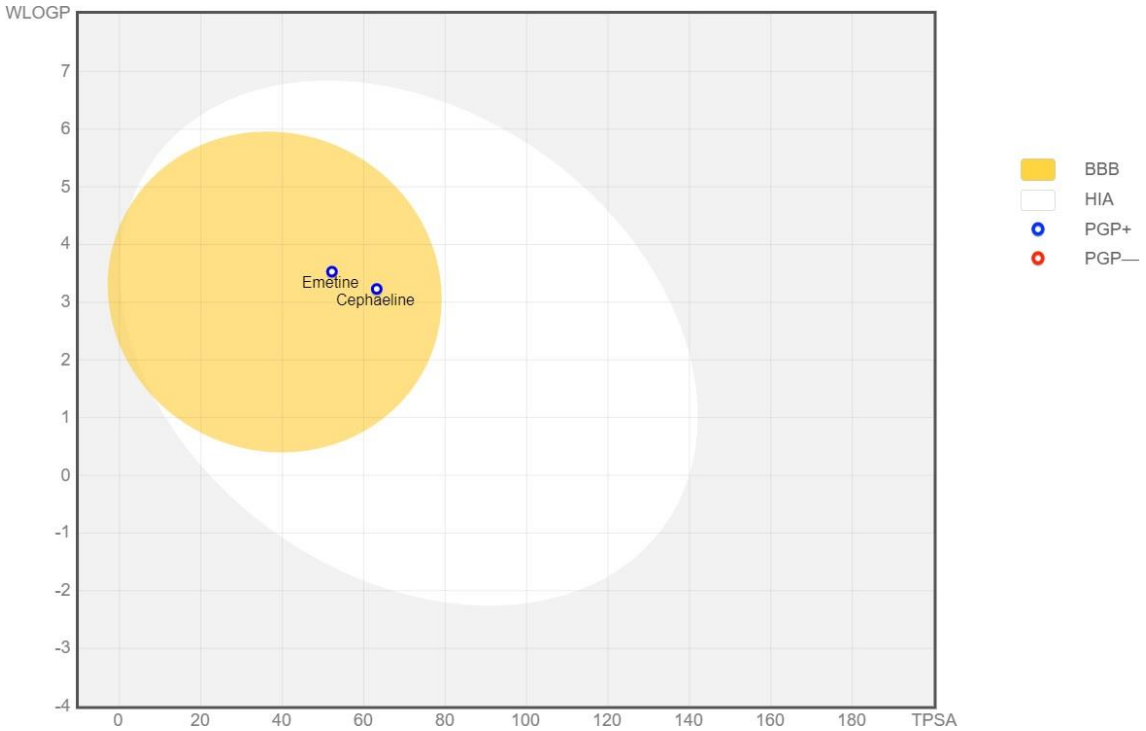


Figure 3: Comparative gastrointestinal absorption and brain penetration of emetine and cephaeline. Data were calculated using the BOILED-Egg model. The points located in the white ellipse represent compounds with high probability to be passively absorbed by the gastrointestinal tract, while the points in the yellow ellipse (i.e., the yolk) are for compounds with high probability to permeate through the BBB to access the CNS (white and yolk are not mutually exclusive). Point colored in blue are for molecules predicted to be substrate of the PGP (PGP+) and hence actively pumped up from the brain or to the gastrointestinal lumen; if predicted non-substrate of the PGP (PGP-), the related point is in red.

As assessed on SwissTargetPrediction, alpha-2A adrenergic receptor (ADRA2A) and putative hydrolase RBBP9 are the most likely protein targets of emetine (probability of ~0.58) and cephaeline (probability of ~0.64), respectively. Despite this difference, the top 15 protein targets of these query molecules comprised mainly family A G protein-coupled receptors (33.3%), electrochemical transporters (20.0%) and voltage-gated ion channels (20.0%) (Figure 4).

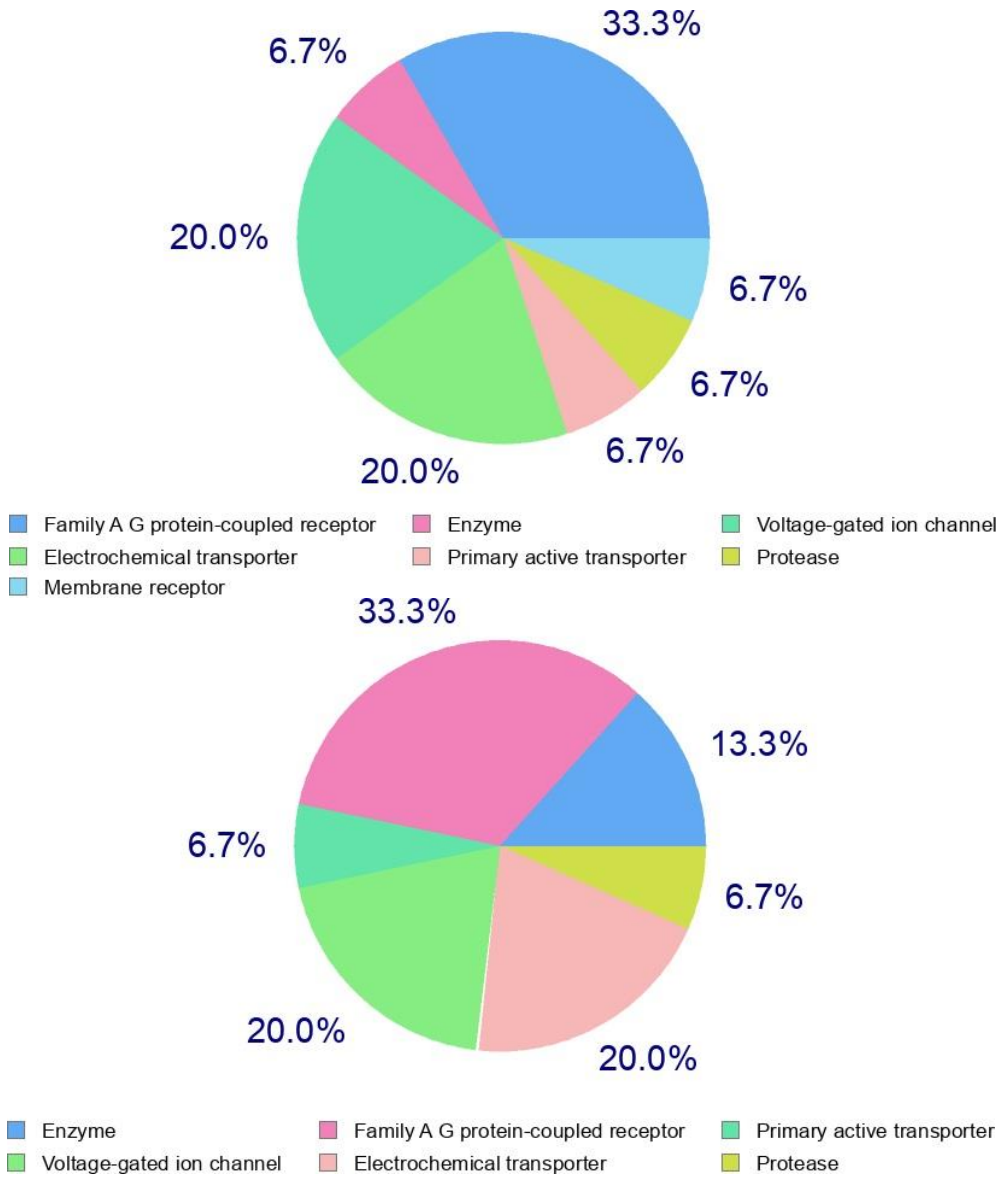


Figure 4: Target classes of emetine (up) and cephaeline (down). Calculations were performed on SwissTargetPrediction based on the top 15 predicted targets for the query molecules.

4. Discussion

The alkaloids emetine and cephaeline are compounds with similar molecular structures, which differ from each other by one of their -OH (cephalin) and OCH3 (emetine) substituents. They have emetic and antiparasitic properties[28,29], extracted from the roots of *Carapichea ipecacuanha* and widely used in traditional medicine, mainly in the treatment of intestinal amebiasis[3]. However, its use has been associated with side effects such as vomiting, nausea and, in high doses, cardiotoxic effects[30]. Yang *et al*. (2018) observed that both molecules inhibited the replication of Zika (ZIKV) and Ebola (EBOV) virus, and that this viral effect is independent of toxicity[17].

Adrenergic receptors are glycoproteins located on the surface of effector cells and are responsible for the adrenergic activity of the sympathetic autonomic nervous system. α-2 adrenergic receptors are inhibitory and, when activated, induce antihypertensive, anxiolytic,

sympatholytic and sedative effects[31]. The predilection (33%) of emetine and cephaeline for the α-2A adrenergic receptor suggests a partial agonist action in the activation of this receptor. These receptors can, for instance, inhibit the release of noradrenaline[32], reduce stomach and intestinal motility and tonus[33], cause dose-dependent changes such as cardiovascular alterations, sedation, and analgesia[34]. The active principles can also bind to adenosine and MU opioid receptors.

Alkaloids have affinity for ionic channels (20%), especially those of potassium activated by high conductance calcium. These channels help restore the resting state after depolarization, or decrease excitability through hyperpolarization[31], which could potentiate a bronchodilator effect, among other effects.

The evaluated compounds also have a predilection for electrochemical receptors (20%), such as histamine H1 receptors in cattle, the bacteria of the intestinal microbiota (*Bacteroides stercoris*) and the synaptic transporter of the vesicular amine. In this case, emetine and cephaeline could be research target drugs for the treatment of Tourette Syndrome (TS), which is characterized by a motor and speech behavioral disorder[35], as one of the accepted theories for the TS is that there is a dysfunction of the involucrate pathways between the cerebral cortex and the basal ganglia[36].

Both alkaloids studied were considered promising agents in the treatment of chronic obstructive pulmonary disease – COPD, as they inhibit or silence the expression of the target microRNA, preventing its translation[16]. Non-coding RNAs play an important role in regulating biological activities such as migration, proliferation and apoptosis[37] and, in the specific case of COPD, it is expected that they can remodel the airways in the treatment of the disease[38].

Cephaeline and, in particular, emetine has considerable anorexigenic effects when administered orally compared to the parenteral route, activity induced by stimulation of the sensory receptor of the gastric mucosa and the central chemoreceptor, with subsequent activation of the trigger zone[39]. Between the two alkaloids, the most cardiotoxic is emetine, the toxic dose is approximately ten times higher than the therapeutic one, and the damage caused by the compound is related to frequent exposure[40]. Emetine can block protein synthesis by binding to ribosomal units, which may be useful in studies related to anorectic activities[14].

Emetine and cephalin alkaloids were evaluated by molecular docking as potential candidates for the treatment of COVID-19. Emetine indicated considerable binding affinity for SARS-CoV2 receptors, proteolytic enzyme 3CLpro, compared to nelfinavir and lopinavir, drugs used in the COVID-19 treatment[15], as well as affinity for the key proteins ACE2, 3CLpro, Mpro, PLpro and RdRp, suggesting that this phytochemical compound has the potential to fight against the virus[41].

The site of action of the emetine in *P. falciparum* is the 40S subunit of the eukaryotic 80S ribosome[42], according to a molecular modeling study that was used to determine potency against multidrug-resistant *P. falciparum* strains (reference clone K1)[43]. Since the 1970s, the description of the evaluated alkaloids has been known as protein synthesis inhibitors[44], findings that were similar with our data. The gametocidal activity of emetine was demonstrated by Panwar *et al*. (2020), findings that corroborates the results obtained in this investigation[45].

Regarding the main limitations of the study, it was not possible to analyze the properties of emetine and cephalin focusing on toxicity parameters. Furthermore, it is necessary to evaluate the possible synergistic effects of emetine and cephalin alkaloids with other chemical compounds present in the root extract of *C. ipecacuanha*.

Regardless of this, preliminary prediction of the main potential targets of emetine and cephaeline in the human, suggest that both alkaloids demonstrate a significant probability of interaction with G protein-coupled receptors of the A family (rhodopsin-like), mainly alpha-1A adrenergic receptors and alpha-2A, in addition to enzymes such as the putative RBBP9 hydrolase and voltage-gated ion channels[46].

5. Conclusions

The molecular docking findings demonstrate that emetine and cephaeline potentially exhibit druglike physical-chemical and pharmacokinetic properties, with probable high gastrointestinal absorption in humans (HIA) and ability to cross the blood-brain barrier (BBB). A priori, the two compounds do not seem to be able to inhibit the main cytochrome P450 enzymes. Among the probable pharmacological properties, we highlight the possible antiplasmodial activity of the alkaloid's emetine and cephaeline, by binding to protein receptors; the pharmacological potential in the treatment of COVID-19, through binding to the proteolytic enzyme 3CLpro, in addition to the *in silico* evidence as promising compounds in the treatment of chronic obstructive pulmonary disease (COPD), by inhibiting the expression of the target microRNA. However, it is important to carry out other analyzes aiming, for example, to contribute to predicting similar protein domains in *Plasmodium* sp., focus on identifying potential targets of antimalarial activity.

References

1. Wang T, Jiang X, Ruan Y, Zhuang J, Yin Y. Com base na farmacologia de rede e experimentos in vitro para provar a inibição efetiva da fibrose miocárdica pela decocção de Buyang Huanwu. **Bioengenharia.** 2022; 13 (5):13767–13783.

2. Campelo MF, Lameira AO, Moreira RKVPP, Ramires ACS. Morphological evaluation of *Carapichea ipecacuanha* (Brot.) L. Andersson. **Research, Society and Development**. 2021. [S. l.], v. 10, n. 6, p. e23110615282. DOI: 10.33448/rsd-v10i6.15282.

3. Lameira O.A. **Cultivo da Ipecacuanha [Psychotria ipecacuanha (Brot.) Stokes].** Embrapa: Circular técnica. 2002; 28, 1-4.

4. Nomura T, Quesada AL, Kutchan TM. The New β-DGlucosidase in Terpenoid-Isoquinoline Alkaloid Biosynthesis in *Psychotria ipecacuanha*. **Journal of Biological Chemistry.** 2008; 283(50):34650–34659. DOI: 10.1074/jbc. m806953200.

5. Kutchana T, Nomuraa T. Three new O-methyltransferases are sufficient for all O-methylation reactions of ipecac alkaloid biosynthesis in root culture of *Psychotria ipecacuanha*. **Journal of Biological Chemistry.** 2010; 285(10):7722-7738. DOI: 10.1074/jbc.m109.086157.

6. Ocampo R. Ipecacuana: un producto no maderable cultivado bajo el bosque en Costa Rica en 1980-2000. **Agron. Costarricense**. 2007 ;31(1): 113-119.

7. Burhans WC, Vassiley LT, Wu JM, Nallaseth FS, Depamphilis ML. Emetine allows identification of origins of mammalian DNA replication by imbalanced DNA synthesis, not through conservative nucleosome segregation. **EMBO J.** 1991; 10: 4351-4360.

8. Garcia RMA, Oliveira LO, Moreira MA, Barros WS. Variation in emetine and cephaeline contents in roots of wild Ipecac (*Psychotria ipecacuanha*). **Biochemical systematics and ecology.** 2005; 33(3):233-243, 2005. DOI: 10.1016/j.bse.2004.08.005.

9. Botero C, Urrea A, Naranjo E. Potencial de regeneración de *Psychotria ipecacuanha* (Rubiaceae) a partir de capas delgadas de células. **Acta Biológica Colombiana.** 2015; 20(3): 181. DOI: 10.15446/abc.v20n3.47354.

10. Valadão ALC, Abreu CM, Dias JZ, Arantes P., Verli H., Tanuri A., Aguiar RS. Natural plant alkaloids (emetine) inhibits HIV-1 replication by interfering with reverse transcriptase activity. **Molecules.** 2015; 20:11474–11489. DOI: 10.3390/molecules200611474.

11. Khandelwal N., Chander Y., Rawat KD, Riyesh T., Nishanth C., Sharma S., Jindal N., Tripathi BN, Barua S., Kumar N. Emetine inhibits replication of RNA and DNA viruses without generating drug-resistant virus variant. **Antivir. Res.** 2017; 144:196–204. DOI: 10.1016/j.antiviral.2017.06.006.

12. Akinboye E, Bakare O. Biological activities of emetine. **The Open Nat Prod J.** 2011; 4:8-15. ISSN 1874-8481.

13. Sun Q, Fu Q, Li S, Li J, Liu S, Wang Z, *et al*. Emetine exhibits anticancer activity in breast cancer cells as an antagonist of Wnt/β-catenin signaling. **Oncol Rep.** 2019;42(5):1735-1744.

14. Wu TH, Chang SY, Shih YL, Huang TW, Chang H, Lin YW. Emetine synergizes with cisplatin to enhance anti-cancer efficacy against lung cancer cells. **Int J Mol Sci.** 2019;20(23):5914. DOI: 10.3390/ijms20235914.

15. Sisakht M, Mahmoodzadeh A, Darabian M. Plant-derived chemicals as potential inhibitors of SARS-CoV-2 main protease (6LU7), a virtual screening study. **Phytother Res**. 2021;35(6):3262–3274. DOI: 10.1002/ptr.7041.

16. Zhang J, Liu J, Xu S, Yu X, Zhang Y, Li X, Zhang L, Yang J, Xing X. Bioinformatics analyses of the pathogenesis and new biomarkers of chronic obstructive pulmonary disease. **Medicine (Baltimore).** 2021 Nov 19; 100(46):e27737. DOI: 10.1097/MD.0000000000027737

17. Yang S, *et al*. Emetine inhibits Zika and Ebola virus infections through two molecular mechanisms: inhibiting viral replication and decreasing viral entry. **Cell Discov.** 2018 Jun 5; 4:31. DOI: 10.1038/s41421-018-0034-1

18. Schuhmacher A, Gassmann O, Hinder M. 2016. Changing R&D models in research-based pharmaceutical companies. **J Transl Med** 14:105. doi: 10.1186/s12967-016-0838-4.

19. Tajuddeen N, Van Heerden FR. Antiplasmodial natural products: an update. **Malar J.** 2019;18(404):1–62. doi: 10.1186/s12936-019-3026-1.

20. Haidara M, Haddad M, Denou A, Marti G, Bourgeade-Delmas S, Sanogo R. In vivo validation of antimalarial activity of crude extracts of *Terminalia macroptera*, a Malian medicinal plant. **Malar J.** 2018; 17:68. doi: 10.1186/s12936-018-2223-7.

21. Wahyuni DK, Rahayu S, Purnama PR, Saputro TB, Suharyanto, Wijayanti N, Purnobasuki H. Morpho-anatomical structure and DNA barcode of *Sonchus arvensis* L. **Biodiversitas**. 2019; 20:2417–26. doi: 10.13057/biodiv/d200841.

22. Wahyuni DK, Wacharasindhu S, Bankeeree W, Wahyuningsih SPA, Ekasari W, Purnobasuki H, Punnapayak H, Prasongsuk S. In vitro and in vivo antiplasmodial activities of leaf extracts from *Sonchus arvensis* L. **BMC Complement Med Ther.** 2023 Feb 14; 23:47. DOI: 10.1186/s12906-023-03871-7.

23. Meng X-Y, Zhang H-X, Mezei M, Cui M. Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. **Curr Comput Aided Drug Des.** 2011 Jun; 7(2):146-157. DOI: 10.2174/157340911795677602.

24. Bolton EE, Wang Y, Thiessen PA, Bryant SH. PubChem: integrated platform of small molecules and biological activities. **Annual Reports in Computational Chemistry**, v. 4, p. 217–241, 2008. https://doi.org/10.1016/S1574-1400(08)00012-1.

25. Daina A, Michelin O, Zoete V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific Reports**, v. 7, p. 42717, 2017. https://doi.org/10.1038/srep42717.

26. Daina A, Zoete V. A BOILED-Egg to predict gastrointestinal absorption and brain penetration of small molecules. **Chem Med Chem,** v. 11, n. 11, p. 1117–1121, 2016. DOI: 10.1002/cmdc.201600182

27. Gfeller D, Grosdidier A, Wirth M, Daina A, Michelin O, Zoete V. SwissTargetPrediction: a web server for target prediction of bioactive small molecules. **Nucleic Acids Research,** v. 42, p. W32–W38, 2014. https://doi.org/10.1093/nar/gku293.

28. Matthews H, Usman-Idris M, Khan F, Read M, Nirmalan N. Drug repositioning as a route to anti-malarial drug discovery: preliminary investigation of the in vitro anti-malarial efficacy of emetine dihydrochloride hydrate. **Malar. J.** 2013; 12:359. doi: 10.1186/1475-2875-12-359.

29. Krstin S, Mohamed T, Wang X, Wink M. How do the alkaloids emetine and homoharringtonine kill trypanosomes? An insight into their molecular modes of action. **Phytomedicine.** 2016; 23:1771–1777. doi: 10.1016/j.phymed.2016.10.008.

30. Yang WC, Dubick M. Mecanismo de cardiotoxicidade emetina. **Pharmacol. Lá.** 1980; 10 :15–26. doi: 10.1016/0163-7258(80)90007-8.

31. Ritter J M, Flower R, Henderson G, Loke YK, MacEWan D, Rang HP. **Rang & Dale: farmacologia.** 9ª ed. GEN Guanabara Koogan. 2020. 808 páginas.

32. Elfenbein JR, Sanchez LC, Robertson SA, Cole CA, Sams R. Effect of detomidine on visceral and somatic nociception and duodenal motility in conscious adult horses. **Veterinary Anaesthesia and Analgesia, Davis,** v. 36, n. 2, p. 162-172, 2009.

33. Valverde A. Alpha-2 agonists as pain therapy in horses. Veterinary clinics of North America. **Equine practice, Guelph**, v. 26, n. 3, p. 515-532, 2010.

34. Souza JFF, Monteiro ER, Campagnol D, Ramos RC, Frasson AMF. Evaluation of nociception, sedation, and cardiorespiratory effects of a constant rate infusion of xylazine alone or in combination with lidocaine in horses. **Journal of Equine Veterinary Science.** v.1, p.1-7, 2011.

35. Forcadell E, Garcia-Delgar B, Nicolau R, Pérez-Vigil A, Cordovilla C, Lázaro L, Ibáñez L, Mir P, Madruga-Garrido M, Correa-Vela M, Morer A. Tic disorders and premonitory urges: validation of the Spanish-language version of the Premonitory Urge for Tics Scale in children and adolescents. **Neurologia** (Engl Ed). 2022 Jul 9; S2173-5808(22)00071-2. DOI: 10.1016/j.nrleng.2020.09.005.

36. Efron D, Dale RC. Tiques e síndrome de Tourette. **J Paediatr Child Health.** 2018; 54(10):1148-1153. DOI: 10.1111/jpc.14165.

37. Ding L, Gu H, Xiong X, *et al*. MicroRNAs involved in carcinogenesis, prognosis, therapeutic resistance and applications in human triple-negative breast cancer. Cells 2019; 8:1492.

38. Xu H, Ling M, Xue J, *et al*. Exosomal microRNA-21 derived from bronchial epithelial cells is involved in aberrant epithelium-fibroblast cross-talk in COPD induced by cigarette smoking. Theranostics 2018;8:5419–33.

39. Yen M, Ewald MB. Toxicity of weight loss agents. **J Med Toxicol.** 2012 Jun; 8(2): 145-152. DOI: 10.1007/s13181-012-0213-7.

40. Schiff RJ, Wurzel CL, Brunson SC, Kasloff I, Nussbaum MP, Frank SD. Death due to chronic syrup of ipecac use in a patient with bulimia. **Pediatrics.** 1986;78(3):412–416.

41. Lu L, Liu L-P, Gui R, Dong H, Su Y-R, Zhou X-H, Liu F-X. Discovering common pathogenetic processes between COVID-19 and sepsis by bioinformatics and system biology approach. **Front Immunol.** 2022 Aug 31; 13:975848. DOI: 10.3389/fimmu.2022.975848.

42. Wong W, Bai XC, Brown A, Fernandez IS, Hanssen E, Condron M, Tan YH, Baum J, Scheres SH. 2014. Cryo-EM structure of the *Plasmodium falciparum* 80S ribosome bound to the anti-protozoan drug emetine. **Elife** 3:03080. doi: 10.7554/eLife.03080.

43. Trott O, Olson AJ. 2010. AutoDock Vina: melhorando a velocidade e a precisão do encaixe com uma nova função de pontuação, otimização eficiente e multithreading. **J Comput Chem** 31 :455–461. doi: 10.1002/jcc.21334.

44. Perlman S, Penman S. 1970. Síntese de proteína mitocondrial: resistência à emetina e resposta a inibidores da síntese de RNA. **Biochem Biophys Res Commun** 40 :941–948. doi: 10.1016/0006-291x(70)90994-0.

45. Panwar P, Burusco KK, Abubaker M, Matthews H, Gutnov A, Fernández-Álvaro E, Bryce RA, Wilkinson J, Nirmalan N. Lead Optimization of Dehydroemetine for Repositioned Use in Malaria. **Antimicrob Agents Chemother.** 2020 Mar 24;64(4):e01444-19. doi: 10.1128/AAC.01444-19.

46. Wenda Wua,b, Hui-Ren Zhoub, Xiao Panc,d, James J. Pestka. Comparison of anorectic potencies of the trichothecenes T-2 toxin, HT-2 toxin and satratoxin G to the ipecac alkaloid emetine. **Toxicology Reports.** 2015 Jan 2; 2(2015):238-251.

APÊNDICE

APÊNDICE 1

INSTITUTO EVANDRO CHAGAS SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE E AMBIENTE	**INSTITUTO EVANDRO CHAGAS - IEC/SVSA/MS** **SEÇÃO/SERVIÇO/SETOR - SAPAR** **PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO - POP**	**POP SAPAR 00.00 - 000** **Revisão: 01** **Página 135 de 148** **Data efetiva: 30/01/2023**

PROCEDIMENTO PARA CULTIVO CONTÍNUO DAS CEPAS DE *Plasmodium falciparum*

Aprovado por: *Giselle Maria Rachid Viana*	**Seção de Parasitologia**	**20/02/2023**
Verificado por: *José Maria Nascimento de Souza*	**Seção de Parasitologia**	**15/02/2023**
Elaborado por: Christian Neri Lameira	**Seção de Parasitologia**	**30/01/2023**

Sumário

1 Objetivo

2 Campo de aplicação

3 Definições

4 Siglas

5 Responsabilidades

6 Procedimentos

7 Referências

8 Documentos complementares

9 Histórico do documento

PROCEDIMENTO PARA CULTIVO CONTÍNUO DAS CEPAS DE *Plasmodium falciparum*

1. Objetivo

Estabelecer os procedimentos operacionais padrão para o cultivo contínuo (*in vitro*) das cepas de *Plasmodium falciparum*, em especial, os clones W2, Dd2 e 3d7.

2. Campo de aplicação

O procedimento laboratorial para realizar o cultivo contínuo das cepas de *Plasmodium falciparum* está descrito para ser executado por técnicos, estudantes, colaboradores e pesquisadores, que têm vínculo formal com o IEC e desenvolvem atividades no Laboratório de Pesquisas Básicas em Malária da Seção de Parasitologia (LPBM/SAPAR).

3. Definições

Para efeito deste POP, aplicam-se as seguintes definições:

Cultivo contínuo: Ensaio laboratorial que permite a manutenção *in vitro* dos estágios sanguíneos de *Plasmodium falciparum*, pela técnica de Trager e Jensen (1976), que necessita de grande quantidade de parasitos coletados em curto espaço de tempo.

Cepa: Conjunto de parasitos obtidos de uma só vez, normalmente, por meio da coleta de amostra biológica via punção sanguínea intravenosa a partir de um indivíduo cujo diagnóstico laboratorial, realizado pela microscopia (Gota Espessa e/ou Distensão Sanguínea), tenha revelado a presença de formas sugestivas de *Plasmodium falciparum*. É importante mencionar que este conjunto de parasitos pode ter sido originado de uma ou diferentes picadas pelo vetor anofelino, em um único momento ou em ocasiões diferentes, razão pela qual os parasitos podem, provavelmente, ser geneticamente distintos uns dos outros.

Clone: População geneticamente pura, proveniente da multiplicação dos estágios eritrocitários do *Plasmodium falciparum*, a partir de um único estágio parasitário (anel ou trofozoíto jovem) obtido, normalmente, por diluição ou micromanipulação ou, no caso da malária experimental, oriundo de roedores a partir de um único esporozoíto (Rosário, 1981; Trager *et al*., 1981).

Meio RPMI: Sistema de tamponamento com bicarbonato e concentrações modificadas de aminoácidos essenciais e vitaminas para estimular o crescimento celular do parasito.

4. Siglas

EPI: Equipamento de Proteção Individual.

P. falciparum ou *Pf: Plasmodium falciparum*.

UV: ultravioleta, luz.

GE: Gota Espessa.

DS: Distensão Sanguínea.

5. Responsabilidades

A elaboração deste protocolo foi realizada conjuntamente pelos pesquisadores e técnicos, e a responsabilidade de aplicação será de todos que atuam no LPBM/SAPAR/IEC, nas linhas de pesquisa que envolvem procedimentos de cultivo contínuo das cepas de *Plasmodium falciparum*.

6. Procedimentos

6.1 Materiais principais

- Borrifador com álcool a 70%.
- Becker para descarte de ponteiras, meio de cultivo e reagentes, com hipoclorito de sódio.
- Caneta de marcação permanente.
- Garrafa de meio plástica, estéril e descartável.
- Gaze.
- Suporte para tubos de centrífuga.
- Lápis preto (comum).
- Luva cirúrgicas (látex), estéreis e descartáveis.
- Pipetas tipo Pasteur®, de plástico, estéreis e descartáveis, e/ou de vidro (autoclaváveis).
- Ponteiras estéreis e descartáveis (volumes principais: 10, 50, 100, 200 e/ou 1.000 µL).
- Tubo tipo Falcon®, com capacidade para 15 mL.
- Lâminas de vidro para microscopia, com borda fosca.

6.2 Equipamentos

- Estufa incubadora, estabilizada em 37ºC.
- Cabine biológica de fluxo laminar vertical.
- Mistura de gases, contendo 90% de N2, 5% de CO2 e 5% de O2.
- Micropipetas automáticas (capacidades principais: 50-10, 10-200 e 100-1000 µL).

6.3 Reagentes e soluções

- Meio RPMI incompleto.
- Bicarbonato de sódio a 7,5%.

- Gentamicina.
- Plasma humano, tipo “A” +.

6.4 Higienização da cabine biológica de fluxo laminar

- Calçar as luvas de procedimento e iniciar a limpeza da cabine biológica de fluxo laminar, borrifando o álcool a 70% no interior da referida cabine e espalhando-o com um pedaço de gaze;
- Ligar a luz ultravioleta (UV) e deixar agir por 15 minutos;
- Enquanto a luz UV estiver ligada, separar todos os materiais necessários ao procedimento de cultivo contínuo. ALERTA: consultar *checklist* ao lado superior esquerdo da cabine;
- Desligar a luz UV e, em seguida, depositar todos os materiais separados no interior da cabine, borrifando álcool a 70% em cada um dos materiais e ligar novamente a lâmpada UV por mais 15 minutos;

6.4.1 Preparação do meio RPMI completo para cultivo contínuo de *P. falciparum*

- Em uma garrafa estéril com capacidade para, no mínimo, 100 mL, acrescentar 86,8 mL de meio RPMI incompleto (volume necessário para a preparação de volume total de 100 mL de meio completo);
- Adicionar 3,21 mL da solução de bicarbonato de sódio a 7,5% estéril;
- Em seguida, acrescentar 20 mL de Gentamicina na concentração de 50 mg/mL;
- Acrescentar 10 mL de plasma humano tipo “A” + e homogeneizar a solução do meio RPMI completo.

Observação: Para o caso de descongelamento de cepa do parasito ou quando se tratar de uma nova cepa, o meio de cultivo deverá ser suplementado a 20%, ou seja, 76,8 mL de meio incompleto e 20 mL de plasma tipo “A” +, até observar, pela morfologia dos estágios do parasito nas lâminas de microscopia, que o parasito já está adaptado, ou readaptado, conforme o caso.

6.4.2 Manutenção do cultivo contínuo de *P. falciparum*

- Retirar as garrafas com o meio RPMI de cultivo da estufa;
- Borrifar toda a superfície externa das garrafas com álcool a 70%;
- Depositar as garrafas na cabine biológica de fluxo laminar, com todo cuidado, para evitar que a película de hemácias sedimentada na parede das mesmas não seja homogeneizada;

- Com auxílio de uma pipeta tipo Pasteur® de 5 ou 10 mL, retirar o máximo possível do meio RPMI de cultivo da garrafa, procurando evitar a captura das hemácias ali depositadas;
- Com cuidado, inclinar a garrafa para um lado (ângulo de aproximadamente 45º) e com uma pipeta tipo Pasteur® de ponta fina, retirar, do lado oposto, uma alíquota de mais ou menos 10 µL de sangue e preparar uma lâmina para microscopia com GE e DS, que deve ser corada pelo método de Walker e Giemsa, conforme o caso, e avaliada antes de prosseguir para a etapa da troca de meio RPMI de cultivo.
- Para que os estágios do parasito não “entrem em sofrimento”, pode ser adicionado novo meio RPMI de cultivo completo, equivalente a aproximadamente 30 a 50% do volume final. Deixar a garrafa dentro da cabine biológica com o fluxo laminar ligado.
- Após a leitura da lâmina com GE e DS, prosseguir com os procedimentos, completando com o restante do meio RPMI completo ou outros afazeres técnicos afins;
- Se, por um acaso, a densidade parasitária estiver alta (), esta deve ser ajustada, fazendo diluição com a adição de hemácias do tipo “O” +, lavadas. Caso contrário, prosseguir com as etapas seguintes, seja criopreservação, duplicação, sincronização, etc.
- Em seguida, acrescentar o restante do meio RPMI de cultivo completo;
- Proceder com a homogeneização;
- Acrescentar a mistura de gases por período de 30 segundos nas garrafas com volume de 50 mL e 60 segundos nas garrafas com volume de 250 mL, tampando-as logo em seguida, para que o ambiente interno das garrafas mantenha a atmosfera de gás carbônico dentro das mesmas e, com cuidado, retirá-las da cabine biológica de fluxo laminar, incubando-as novamente na estufa a 37°C.

- **Observação:** A adição de hemácias lavadas deve ser efetuada de 3 em 3 ou de 4 em 4 dias, mesmo que a densidade parasitária do cultivo contínuo não aumente. Este procedimento tem a finalidade de reoxigenar a atmosfera do cultivo contínuo, auxiliando no crescimento parasitário.

7. Segurança

É imprescindível usar jalecos descartáveis, luvas cirúrgicas estéreis e descartáveis, máscaras cirúrgicas estéreis e descartáveis, pró-pés descartáveis e gorros descartáveis (EPI) durante todo o procedimento laboratorial e proceder com o descarte do material (lâminas quebradas, agulhas, gaze, pipeta tipo Pasteur®, etc.) de trabalho em recipiente adequado, conforme a classificação de cada material para descarte.

8. Registro dos resultados

O registro dos resultados deverá ser feito em fichas digitais padronizadas pelo LPBM/SAPAR, além da anotação nos livros específicos de laboratório.

9. Referências

ROSARIO, V.E. Cloning of naturally occurring mixed infections of malaria parasites. **Science**, v. 212, p. 1037-1038. 1981.

TRAGER, W.; JENSEN, J. B. Human malaria parasites in continuous culture. **Science**, v. 193, n° 4254, p. 673-75. 1976.

TRAGER, W., TERSHAKOVEC, M., YANDVERT, L., STANLEY, H., LANNERS, N., SUBERT, E. Clones of the malaria *Plasmodium falciparum* obtained by microscopic selection: their characterization with regards to knobs, chloquine sensitivity, and formation of gametocytes. **Proc. Nate. Sci.**, v. 78, nº 10, p. 6527-6530. 1981.

10. Documentos complementares

- PAR-POP 002.

11. Histórico do documento

Documento inicialmente elaborado em 05/07/2016 e aprovado em 02/08/2016.

REVISÃO	DATA	HISTÓRICO	RESPONSÁVEL
01	*30/01/2023*	*Documento inicialmente elaborado em 05/07/2016 e aprovado em 02/08/2016.*	*Christian Neri Lameira* *José Maria Nascimento de Souza* *Giselle Maria Rachid Viana*

ANEXOS

ANEXO 1

Capítulo 1 em processo de publicação no livro “Avanços nos Estudos da Biodiversidade e Biotecnologia na Amazônia”.

©2021 Universidade Federal Rural da Amazônia

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Ministro: Milton Ribeiro

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA
Reitora: Herdjania Veras de Lima
Vice-Reitor: Jaime Viana de Sousa

GERENTE DA EDITORAÇÃO
Suely Nazaré Furtado França

COMISSÃO EDITORIAL
Antônia Benedita da Silva Bronze
Israel Hidenburgo Ancieto Cintra
Leony Soares Marinho
Suely Nazaré Furtado França
Tabilla Verena da Silva Leite

EQUIPE EDITORIAL
Cristiane do Espírito Santo Coelho
Inácia Faro Libonati
Marcelle Cristina da Silva Lima
Renan Michel da Costa Ribeiro
Socorro de Fatima Souza da Silva Viégas

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE
Ministra: Izabella Teixeira

CONSELHO EDITORIAL PPG (BIONORTE-PA)
Dra. Carolina Joana da Silva
Dr. Jair Max Furtunato Maia
Dra. Léa Maria Medeiros Carreira
Dra. Maria Paula Cruz Schneider

ORGANIZADORES
Cândido Neto
Eloisa Andrade
Maria de Lourdes Ruivo

CAPA
Mozaniel Oliveira, Eloisa Andrade

FOTOS DA CAPA
Cândido Neto: plântulas de paricá (*Schizolobium amazonicum*);
Eloisa Andrade: aningal/Tucunduba, *Piper marginatum*, *Phaseo sagittalis*, *Bixa orellana*, Flona de Caxiuanã;
Marcos Diones: fungo (*Phallus*)
Tulio Dornas: pássaro (*Chloroceryle inda*).

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.160/98)

Av. Tancredo Neves, 2501, CEP: 660077-530 –Terra Firme E-mail: editora@ufra.edu.br
Editora Associada a Associação Brasileira das Editoras Universitárias – ABEU

O 48 Oliveira Neto, Cândido Ferreira de

Avanços nos estudos da biodiversidade e biotecnologia na Amazônia/ Cândido Ferreira de Oliveira Neto, Eloisa Andrade, Maria de Lourdes Ruivo. – Belém: UFRA/ UFPA/ MPEG, 2021
295 p.: il.; PDF.

ISBN: 978-65-994846-2-9

1. Biodiversidade. 2. Biotecnologia. 3. Amazônia - Biodiversidade. I. Andrade, Eloisa . II. Ruivo, Maria de Lourdes. III. Título.

CDD 23. ed. 333.95

Elaborada por Cristiane do Espírito Santo Coelho - CRB2/1027

ANEXO 2

Capítulo 2 publicado no livro “Pesquisa em Saúde & Ambiente na Amazônia: perspectivas para sustentabilidade humana e ambiental na região”.

14

Contribuições das plantas medicinais para o tratamento da malária: um referencial teórico

Christian Neri Lameira
PPGBIONORTE • Pólo Pará

Marinete Marins Póvoa
IEC/SVS/MS e PPGBAIP

Salma Gomes de Oliveira
IEC/SVS/MS

Nathália Nogueira Chamma Siqueira
IEC/SVS/MS

José Maria de Souza Nascimento
IEC/SVS/MS

José Mário Veloso Peres
IEC/SVS/MS

Maria Fani Dolabela
UFPA

Giselle Maria Rachid Viana
IEC/SVS/MS

doi 10.37885/210504800

ANEXO 3

Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética e Pesquisa do Instituto Evandro Chagas.

INSTITUTO EVANDRO CHAGAS/IEC/SVS/MS

Plataforma Brasil

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADE ANTIMALÁRICA de Psychotria ipecacuanha (Brot.) Stoves ¿ (Rubiaceae)

Pesquisador: Christian Neri Lameira

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 57367321.2.0000.0019

Instituição Proponente: Instituto Evandro Chagas/SVS/MS

Patrocinador Principal: Instituto Evandro Chagas/SVS/MS
Financiamento Próprio
Embrapa Amazônia Oriental

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.461.798

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto de doutoramento sobre possível fármaco para o tratamento de malária, apesar de