

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE MEDICINA

DALILA NUNES CYSNE

POTENCIAL ANTIMALÁRICO DAS FOLHAS DE *Chenopodium ambrosioides* L.

São Luís
2015

DALILA NUNES CYSNE

POTENCIAL ANTIMALÁRICO DAS FOLHAS DE *Chenopodium ambrosioides* L.

Artigo apresentado ao Curso de Medicina da Universidade Federal do Maranhão como requisito para obtenção do grau de médico (a).

Orientador (a): Prof.^a Dr.^a Flávia Raquel Fernandes do Nascimento.

São Luís

2015

Cysne, Dalila Nunes

Potencial antimalárico das folhas de *Chenopodium ambrosioides* L./Dalila Nunes Cysne. – São Luís, 2015.

34 f.

Orientador (a): Prof^a Dr^a Flávia Raquel Fernandes do Nascimento.

Monografia (Graduação em Medicina) –Universidade Federal do Maranhão, 2015.

1.Malária-Tratamento 2.*Plasmodium* 3. Mastruz 4.Flávia Raquel Fernandes do Nascimento (orientador) II. Título.

CDU 619.935

DALILA NUNES CYSNE

POTENCIAL ANTIMALÁRICO DAS FOLHAS DE *Chenopodium ambrosioides* L.

Artigo apresentado ao Curso de Medicina da Universidade Federal do Maranhão como requisito para obtenção do grau de médico (a).

Aprovado em: ____ / ____ / ____

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Flávia Raquel Fernandes do Nascimento – Orientador (a)
Universidade Federal do Maranhão

Prof.^a Dr.^a Conceição de Maria Pedrozo e Silva de Azevedo – Examinador (a)
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Me. Aramys Silva dos Reis – Examinador (a)
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Paulo Vítor Soeiro Pereira – Examinador (a)
Universidade Federal do Maranhão

À minha família – sinônimo de amor e confiança.

À minha segunda família, o LIF – sinônimo de amizade e inspiração.

AGRADECIMENTOS

Além do aspecto científico, um trabalho de conclusão de curso sempre nos remete às muitas pessoas que estiveram, e ainda estão, ao nosso lado durante a jornada da graduação. Não faltam motivos para agradecer. Antes de tudo, porém, agradeço a Deus pela presença e cuidado presentes em cada minuto da minha vida.

À minha família, a minha eterna gratidão. Aos meus pais, Anacleia e Francisco, agradeço pelo amor que me acompanha a cada instante, por confiarem em cada caminho que escolhi e por me motivarem a tentar dar o melhor sempre. Aos meus irmãos e grandes amigos, Ana Lenira e Aderaldo, por se alegrarem com cada pequena vitória da minha vida e por jamais medirem esforços para me ajudar. Aos meus cunhados, Valéria e Eloi, por todo o carinho e por sempre terem de palavras de incentivo.

Àquela que esteve ao meu lado durante os pequenos e grandes momentos da minha graduação: obrigada, professora Flávia, por não somente ter me apresentado ao mundo da ciência, mas por ter, pacientemente, me ensinado a caminhar nele. Minha graduação não seria a mesma sem todo seu exemplo e incentivo. Somado a tudo isso, jamais poderia deixar de agradecer a sua amizade, apoio e conselhos que me acompanham e que alcançam, indubitavelmente, distâncias.

Às queridas professoras Lucilene (Lu) e Ana Paula, que me apoiaram de forma direta e efetiva durante todos esses anos no LIF. Obrigada por todos os ensinamentos (não foram poucos!), assim como por todo carinho e amizade, presentes que levarei sempre comigo.

Ao Bruno, “meu irmão adotivo”, que literalmente segurou a minha mão e pacientemente me introduziu nesse mundo dos protocolos e experimentos científicos. Bruno, foi um grande privilégio ter tido você como meu primeiro “professor” no LIF e tanto ter aprendido com seu exemplo. Muito obrigada!

À Thiare, a quem só posso agradecer por todo o empenho depositado nesse trabalho, ele não existiria sem toda a sua dedicação. Ainda bem que nessa reta final eu tive a oportunidade de trabalhar com você, que, sem dúvidas, muito me ensinou. Obrigada, Thika, as suas mãos estão aqui!

Ao Aramys, que me ensinou, desde o dia que se ausentou do LIF e foi para a USP, que a distância não nos impede de ajudar e contribuir. Obrigada, “chefe”, por atenciosamente ter respondido a cada uma das minhas muitas mensagens e dúvidas. Você é um grande exemplo!

À professora Rosane Guerra, a pessoa que deu os primeiros passos para o início dessa grande família que se tornou o LIF. Acompanhei seu trabalho durante esses anos, e agora foi

um prazer poder contar com ele diretamente na construção deste artigo. Muito obrigada, professora, pela disponibilidade, tempo e sugestões dadas!

À dona Joana, nossa amiga, que nunca titubeia em nos dar o mais sincero abraço.

A todos os professores, pós-graduandos e ICs do LIF, com quem tive a oportunidade de muito aprender. Aqui destaco meus queridos amigos Johnny, Daniel, Izabel, Wanderson e Eder, pessoas com quem tive o privilégio de fazer experimentos durante minha iniciação científica, compartilhando momentos inesquecíveis, bem como os professores (e amigos) Graciomar, Paulo Vítor, João, Márcia e Mayara, por sempre estarem dispostos a me ajudar em qualquer momento que precisei.

Um agradecimento mais do que especial ao amigo Daniel por ter me ajudado, mesmo à distância, a chegar ao final. Obrigada, Dan, você foi essencial!

À professora Flavia Amaral e ao Laboratório de Fitofármacos da UFMA, pelo preparo do extrato de mastruz utilizado.

Ao professor Roberto Nicolete e toda sua equipe do Laboratório de Biotecnologia Aplicada a Saúde (Fiocruz – RO), em especial à Amália Ferreira, pela acessibilidade, suporte e disponibilidade em contribuir com a realização deste trabalho.

Ao professor Cláudio Marinho, e a toda a equipe do Laboratório de Imunoparasitologia Experimental (ICB - USP), em especial ao Aramys Reis, pelo empenho e participação nos experimentos *in vivo*.

Ao professor Marcos Grisotto e à Ericka Mesquita pela contribuição nos experimentos *in vivo*.

Às agências financiadoras CAPES, CNPq, FAPEMA e FAPESP pelos auxílios fornecidos na realização dessa pesquisa, bem como pelas bolsas concedidas durante minha graduação.

A University of Nevada, Reno, por ter contribuído de forma marcante para a minha formação acadêmica, bem como a todos os grandes amigos-irmãos que lá ganhei.

Aos meus queridos amigos da turma 91 de Medicina da UFMA: Sofia, Hugo, Hanna, Carol, Juliana, Amanda, Evaldo, Francisco (Trindade e Marques), Ellano, Pedro e Iuri. A amizade de vocês é um dos maiores presentes que levarei da graduação. Obrigada pelos momentos que passamos juntos!

A todos os professores, médicos e pacientes com quem tive a oportunidade de muito aprender e que me deram lembranças que carregarei sempre comigo.

À Universidade Federal do Maranhão, pelo suporte na realização dessa pesquisa, bem como pela oportunidade concedida a mim de cursar Medicina.

*Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes.
Assim em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive.*

Fernando Pessoa

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

RESUMO

ABSTRACT

ARTIGO: POTENCIAL ANTIMALÁRICO DAS FOLHAS DE *Chenopodium ambrosioides* L.

1 INTRODUÇÃO	12
2 MATERIAL E MÉTODOS	13
2.1 Material vegetal	13
2.2 Ensaio <i>in vitro</i>	13
2.2.1 Cultura de <i>P. falciparum</i>	13
2.2.2 Sincronização de <i>P. falciparum</i>	14
2.2.3 Interação molecular por ressonância plasmônica de superfície (RPS)....	14
2.2.3 Tratamento <i>in vitro</i> com EBH em cultura de <i>P. falciparum</i> 3D7.....	15
2.3 Ensaio <i>in vivo</i>	15
2.3.1 Animais.....	15
2.3.2 Infecção	15
2.3.3 Tratamento terapêutico com EBH em malária murina	16
2.4 Análise estatística	16
3 RESULTADOS	16
3.1 O EBH apresenta afinidade de ligação com as proteínas totais de hemácias infectadas por <i>P. falciparum</i> W2	17
3.2 O EBH possui efeito antiplasmódico <i>in vitro</i>	17
3.3 O tratamento terapêutico com EBH é capaz de aumentar a sobrevida e reduzir a parasitemia na malária murina	15
4 DISCUSSÃO	20
5 CONCLUSÕES	23
REFERÊNCIAS	25
ANEXOS	30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ANOVA – Análise de variância (do inglês, *Analysis of variance*);
- CI₅₀ – Concentração inibitória de 50%;
- CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico;
- COBEA – Comissão Brasileira de Experimentação Animal;
- CQ – Cloroquina;
- DP – Desvio padrão;
- EBH – Extrato bruto hidroalcoólico;
- GFP – Proteína fluorescente verde (do inglês, *Green Fluorescent Protein*);
- ILS - Aumento da expectativa de vida (do inglês, *Increment of life span*);
- ip. – Intraperitoneal;
- MST - Mediana do tempo de sobrevivência (do inglês, *Median survival time*);
- NO – Óxido nítrico;
- PBS – Solução salina tamponada com fosfato (do inglês, *Phosphate-buffered saline*);
- PDTIS – Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde;
- RENISUS - Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse do Sistema Único de Saúde;
- RPMI – Meio de cultura produzido no Instituto Memorial Parque Roswell;
- RPS – Ressonância Plasmônica de Superfície;
- WHO – Organização Mundial de Saúde (do inglês, *World Health Organization*).

RESUMO

A malária continua sendo uma das doenças causadas por protozoários de maior impacto mundial, especialmente quando causada por *Plasmodium falciparum*. Esta espécie é responsável pelo maior número de casos graves e mortes. Devido à crescente resistência do parasito aos tratamentos-padrão, a busca por novas alternativas terapêuticas é impreterível. *Chenopodium ambrosioides* L. (Amaranthaceae), popularmente conhecida como “mastruz”, tem efeito plasmodicida *in vitro* e também uma significativa atividade imunomoduladora. Baseado nisso, o objetivo deste trabalho foi investigar o potencial antimalárico do extrato bruto hidroalcoólico das folhas de *Chenopodium ambrosioides* (EBH) em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*. Primeiramente, para avaliar afinidade de ligação do EBH a proteínas totais de hemácias infectadas por *P. falciparum*, um ensaio de ressonância plasmônica de superfície (RPS) foi realizado. Os parasitos foram mantidos em cultura e, após serem sincronizados em fase de anel, as proteínas totais foram quantificadas pelo método de Bradford (150 µg/mL) e utilizadas como ligante no ensaio de RPS. Por outro lado, o EBH e a cloroquina foram utilizados como analitos, nas concentrações de 25, 50 e 100 µg/mL. Em seguida, culturas sincronizadas em fase de anel de *P. falciparum* 3D7 foram expostas a concentrações crescentes (7,8, 15,62, 31,25, 62,5, 125 e 250 µg/mL) do EBH durante 48 horas a fim de testar o efeito plasmodicida *in vitro* do extrato. Após esse tempo, a parasitemia foi determinada com esfregaços corados com Giemsa e foi calculada a CI₅₀ do extrato. Finalmente, foram realizados testes *in vivo* para avaliar o efeito antimalárico do EBH. Camundongos fêmeas Balb/c (8-12 semanas, 20-25 g) foram infectados por via intraperitoneal (ip.) com 10⁴ de *Plasmodium berghei* ANKA-GFP. Sete dias após o inóculo, os animais foram tratados ip. com PBS (n = 5), cloroquina (45mg/kg; n = 5) ou EBH (5 mg/kg; n = 6), durante 3 dias consecutivos. A parasitemia dos animais foi quantificada por citometria de fluxo no 6º, 9º e 11º dias pós infecção e a sobrevivência foi acompanhada até o 21º dia. Os resultados mostraram que a afinidade de ligação do EBH às proteínas totais de hemácias infectadas foi maior do que a observada para a cloroquina, em todas as concentrações analisadas. Além disso, o extrato foi capaz de inibir *in vitro* o crescimento parasitário de forma dose-dependente com CI₅₀ de 25,4 µg/mL. *In vivo*, o tratamento terapêutico com o EBH foi capaz de aumentar a sobrevivência, com um aumento na expectativa de vida (ILS) de 33%, e de reduzir a carga parasitária dos animais infectados. Em conclusão, o EBH teve um efeito antiplasmódico significativo, podendo ser considerado como uma alternativa para o desenvolvimento de novos antimaláricos.

Palavras-chave: malária; *Plasmodium*; tratamento; mastruz.

ABSTRACT

Malaria remains one of the diseases caused by protozoa of larger global impact, especially when it is caused by *Plasmodium falciparum*. This species is responsible for the majority number of severe cases and deaths. Due to the increase of the parasite resistance to standard treatments, the search for new therapeutic alternatives is imperative. *Chenopodium ambrosioides* L. (Amaranthaceae), popularly known as "mastruz", has anti-*Plasmodium* effect *in vitro* and also a significant immunomodulatory activity. Based on that, the objective of this study was to investigate the antimalarial potential of the hydroalcoholic crude extract of the leaves of *Chenopodium ambrosioides* - HCE in experimental models either *in vitro* or *in vivo*. First, to assess the binding affinity of the HCE with the total proteins of erythrocytes infected by *P. falciparum*, a surface plasmon resonance (SPR) was performed. The parasites were maintained in culture and, after being synchronized in ring stage, the total proteins were quantified by the Bradford method (150 µg/ml) and were used as ligand in the assay. In the other hand, the HCE and chloroquine were used as analytes in the concentrations of 25, 50 and 100 µg/mL. Next, synchronized cultures of *P. falciparum* 3D7 in ring stage were exposed to increasing concentrations (7.8, 15.62, 31.25, 62.5, 125 and 250 µg/ml) of HCE for 48 hours in order to test the anti-*Plasmodium* effect of the extract *in vitro*. After that time, the parasitemia was determined by Giemsa stained smear and it was calculated the IC₅₀ of the extract. Finally, *in vivo* tests were performed to evaluate the antimalarial effect of the EBH. Female Balb/c mice (8-12 weeks, 20-25 g) were infected intraperitoneally (ip.) with 10⁴ of *Plasmodium berghei* ANKA-GFP. Seven days after inoculation, the animals were treated ip. with PBS (n = 5), chloroquine (45 mg/kg; n = 5) or HCE (5 mg/kg; n = 6), for 3 consecutive days. The parasitemia of the animals was quantified by flow cytometry on the 6th, 9th and 11th days post infection and the survival was followed until the 21st day. The results showed that the binding affinity of the HCE with the total proteins of infected red blood cells was greater than that observed for the chloroquine, at all the concentrations analyzed. Furthermore, the extract was able to inhibit the parasitic growth *in vitro* in a dose-dependent manner with IC₅₀ of 25.4 µg/mL. *In vivo*, the therapeutic treatment with HCE was able to increase the survival, which corresponded to an increment of life span (ILS) of 33%, and reduce the parasite load of the infected animals. In conclusion, the HCE had a significant anti-*Plasmodium* effect and could be considered as an alternative to the development of new antimalarial drugs.

Keywords: malaria; *Plasmodium*; treatment; mastruz.

ARTIGO: POTENCIAL ANTIMALÁRICO DAS FOLHAS DE *Chenopodium ambrosioides* L.

Dalila Nunes Cysne¹, Thiare Silva Fortes¹, Aramys Silva Reis², Bruno de Paulo Ribeiro¹, Amália dos Santos Ferreira⁴, Flavia Maria Mendonça do Amaral³, Rosane Nassar Meireles Guerra¹, Claudio Romero Farias Marinho², Roberto Nicolete⁴ e Flávia Raquel Fernandes do Nascimento¹

¹Laboratório de Imunofisiologia, Departamento de Patologia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Maranhão (UFMA), 65080-805 São Luís, MA, Brasil.

²Laboratório de Imunoparasitologia Experimental, Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo (USP), 05508-000 São Paulo, SP, Brasil.

³Laboratório de Fitofármacos, Departamento de Farmácia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Maranhão (UFMA), 65085-580 São Luís, MA, Brasil.

⁴Laboratório de Biotecnologia Aplicada à Saúde, Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz Rondônia), 76812-245 Porto Velho, RO, Brasil.

Autor para correspondência: Flávia Raquel Fernandes do Nascimento (nascimentoffr@yahoo.com.br)

RESUMO

Com o intuito de investigar novas alternativas terapêuticas para o tratamento da malária, foi avaliado neste trabalho o efeito antimalárico do extrato bruto hidroalcoólico das folhas de *Chenopodium ambrosioides* L. - EBH. Inicialmente, foi verificada a afinidade molecular de proteínas totais de hemácias infectadas por *P. falciparum* W2 com EBH e cloroquina por ressonância plasmônica de superfície (RPS). Em seguida, foi determinado o potencial plasmodicida do EBH em cultura de *P. falciparum* 3D7. A seguir, usando camundongos Balb/c infectados por via intraperitoneal (ip.) com *P. berghei* ANKA-GFP, foi avaliado o efeito do tratamento ip. durante 3 dias consecutivos com PBS (controle), cloroquina (45 mg/kg) e EBH (5 mg/kg) quanto à sobrevida e à parasitemia dos animais infectados. Os resultados mostraram que o EBH teve afinidade de ligação às proteínas totais de hemácias infectadas e inibiu o crescimento parasitário de forma dose-dependente *in vitro* (CI₅₀ = 25,4 µg/mL). O tratamento terapêutico *in vivo* com o extrato aumentou a sobrevida e reduziu a parasitemia dos animais infectados. Assim, conclui-se que o EBH teve efeito antiplasmódico significativo, podendo ser considerado como uma alternativa para o desenvolvimento de novos antimaláricos.

1 INTRODUÇÃO

A malária continua representando um desafio para a saúde pública mundial [1]. Em 2013, a doença foi responsável por cerca 198 milhões de casos e 584 mil mortes em todo o mundo [2]. Cinco espécies do protozoário do gênero *Plasmodium* são reconhecidamente capazes de causar a doença em humanos [3]. Apesar da espécie *Plasmodium vivax* ter maior distribuição geográfica, *Plasmodium falciparum* tem maior destaque por ser responsável pelo maior número de casos graves e mortes [2].

Atualmente, o tratamento de escolha para a malária por *P. falciparum* é a terapia de combinação baseada em artemisinina [2,4,5], devido à documentada resistência desse parasito a outros antimaláricos, como a cloroquina [6–10]. Não obstante, também já têm sido descritos casos de resistência à artemisinina em cinco países asiáticos: Camboja, República Democrática Popular do Laos, Mianmar, Tailândia e Vietnã [2,11]. Somado a isso, ainda não se dispõe de uma vacina segura, efetiva e mundialmente disponível para a doença. Assim, a busca por novos antimaláricos continua sendo urgente e necessária.

Os produtos naturais constituem importantes armas para o desenvolvimento de novos princípios ativos para o tratamento da malária [7,12,13]. Prova disso é que importantes antimaláricos, tais como quinino e derivados de artemisinina, são derivados de espécies vegetais [14,15].

Chenopodium ambrosioides L. (Amaranthaceae) é popularmente conhecida no Brasil como “erva-de-santa-maria”, “mentrasto”, “mentruço” ou “mastruz” [16,17] e em outros países americanos como “wormseed”, “goosefoot”, “paico” e “epazote” [18,19]. O uso popular dessa planta é extenso, sendo utilizada por exemplo como anti-helmíntico [19], anti-inflamatório [20], antileishmania [17], antidiarreico/antidesintérico [21], dentre outros. Esse potencial terapêutico tem sido de tal forma reconhecido que o Ministério da Saúde do Brasil, em 2008, incluiu esta espécie vegetal na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse do Sistema Único de Saúde (RENISUS) [16].

Nosso grupo de pesquisa já demonstrou que o extrato bruto hidroalcoólico das folhas de *C. ambrosioides* tem significativo efeito antitumoral [22], antileishmania *in vitro* e *in vivo* [23–26], anti-giardia *in vitro* [21] e analgésico [27], além de atividade imunomoduladora [28]. Ademais, outros grupos tem evidenciado que o ascaridol isolado de *C. ambrosioides*, bem como o óleo essencial extraído dessa planta, tem significativa atividade contra *P. falciparum* *in vitro* [29,30].

Entretanto, até o nosso conhecimento, não há trabalhos prévios que avaliem a atividade antimalárica dessa espécie vegetal em modelos animais. Assim, neste trabalho, foram investigados os efeitos antiplasmódicos do extrato bruto hidroalcoólico de *C. ambrosioides* em ensaios *in vitro* e *in vivo*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

As folhas de *C. ambrosioides* foram coletadas no Horto Canaã, localizado no município de Paço do Lumiar – MA, Brasil, e a identificação botânica foi feita no Herbário Ático Seabra da Universidade Federal do Maranhão, com exsicata de número 1148/SLS017213. Foram coletados 4,8 kg do material vegetal e as folhas, depois de limpas, foram secas em estufa a 39 C° e trituradas, resultando em 594 g de matéria prima pulverizada. Estas foram percoladas em uma solução hidroalcoólica a 70% e misturadas a cada 8h, durante 24h, com hidromódulo de 1:5 (P/P). Após este período, o extrato bruto hidroalcoólico de folhas de *C. ambrosioides* – EBH foi filtrado repetidamente por quatro vezes. Em seguida, o EBH foi submetido à filtração e à concentração sob pressão reduzida, para obtenção do extrato seco [31]. O rendimento final foi de 16%, em relação às folhas secas trituradas.

2.2 Ensaio *in vitro*

2.2.1 Cultura de *Plasmodium falciparum*

Formas sanguíneas das cepas de *P. falciparum* W2 (resistentes à cloroquina) e 3D7 (sensíveis à cloroquina) foram mantidas em culturas de suspensão de hemácias humanas de doadores voluntários do sistema ABO do tipo A ou O com fator Rh(+) e com hematócrito de 5%, segundo Trager e Jensen [32]. A cultura foi realizada em meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich), suplementado com 5% de plasma humano desfibrinado A⁺ ou O⁺ ou com albumax (Gibco) na concentração final de 1%, Hepes 22,8 mM (Promega), glicose 11,1 mM (Sigma), HPX 0,36 mM (50 µg/mL) (Sigma), NaHCO₃ 23,8 mM (Merck) e gentamicina 40 µg/mL (Sigma), e condicionada em garrafas plásticas de cultura de 25 cm² (Sarstedt) em estufa a 37°C e 5% de CO₂. O acompanhamento do desenvolvimento do parasito foi realizado

a partir de esfregaços sanguíneos analisados em microscópio óptico. As lâminas foram coradas com Giemsa e observadas em aumento de 1000X.

2.2.2 Sincronização de *P. falciparum*

Culturas de *P. falciparum* W2 ou 3D7 com predomínio de anéis foram utilizados nos ensaios, conforme previamente descrito [33]. Sucintamente, o meio de cultura foi retirado da garrafa de cultura e foram adicionados 10 mL de uma solução de sorbitol 5% e glicose 0,5% ao sedimento contendo o sangue parasitado. O conteúdo foi transferido para um tubo de fundo cônico de 15 mL e incubado a 37°C por 10 min. Após esse período, o material foi centrifugado por 5 min, a 1000 g, à temperatura ambiente. O sobrenadante foi retirado e o sedimento ressuspenso em meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) suplementado com soro humano A⁺ ou O⁺ inativado, ajustando-se o hematócrito para 5%. Essa suspensão foi novamente transferida para uma placa de cultura, e deixada em repouso a 37°C, por aproximadamente 10 min, para que as hemácias sedimentassem. Posteriormente, foi realizado um esfregaço sanguíneo corado com Giemsa para determinação da parasitemia em microscópio óptico. O hematócrito e a parasitemia foram ajustados para todos os testes *in vitro* com adição de hemácias e meio RPMI para 5% e 1%, respectivamente.

2.2.3 Interação molecular por ressonância plasmônica de superfície (RPS)

As análises de interação molecular foram desenvolvidas em sistema Biacore modelo T200 (GE LifeScience), utilizando sensorchips tipo CM-5 como suporte para a molécula ligante. O método de acoplamento do ligante à superfície do chip a ser utilizado foi o acoplamento amina.

Os ensaios de interação entre o ligante imobilizado e os analitos de interesse geralmente ocorrem em condições fisiológicas utilizando tampão HBS-P 1x (0,1M HEPES; 1,5M NaCl; 0,5% surfactante P20; pH 7,4), na temperatura de 37 °C, e outras condições que são dependentes do modelo de interação em estudo.

O presente estudo realizou ensaio de interação molecular utilizando proteínas totais de hemácias infectadas por *P. falciparum* W2 como ligante, em pH 5,0 (acetato 5,0) e a uma concentração de 150 µg/mL. Esse extrato proteico foi obtido após o estabelecimento das culturas de parasitos sincronizadas com predomínio de anéis de *P. falciparum* W2

(hematócrito 5% e parasitemia 1%), quando então foi realizada a dosagem de proteínas totais das hemácias infectadas pelo método de Bradford. Como analitos, foram utilizados EBH e cloroquina nas concentrações de 25, 50 e 100 µg/mL

2.2.4 Tratamento *in vitro* com EBH em cultura de *P. falciparum* 3D7

Após a sincronização dos parasitos para estágio em anel (hematócrito 5% e parasitemia 1%), as culturas foram expostas ao EBH, solubilizado em meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) estéril. O EBH foi diluído seriadamente nas seguintes concentrações: 250, 125, 62,5, 31,25, 15,62 e 7,8 µg/mL. A determinação da concentração do EBH capaz de inibir o crescimento de 50% dos parasitos (CI₅₀), no estágios intraeritrocitários, foi realizada como previamente descrito [34], sendo o tratamento *in vitro* com EBH realizado durante 48 horas. A parasitemia foi determinada em esfregaços corados por Giemsa, imediatamente após o final do tratamento com EBH, segundo a seguinte fórmula:

$$\text{Parasitemia (\%)} = \frac{(\text{Número de hemácias parasitadas})}{\text{Total de hemácias}} \times 100$$

2.3 Ensaio *in vivo*

2.3.1 Animais

Camundongos Balb/c, fêmeas, foram obtidos do Biotério da Universidade de São Paulo (USP), pesando 20-25 g e com idade entre 8 e 12 semanas. Os animais foram mantidos em alojamento convencional e alimentados com dieta regular no Biotério do Departamento de Parasitologia da Universidade de São Paulo. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com o regulamento nacional de bem estar e experimentação animal, autorizados pela Comissão Brasileira de Experimentação Animal (COBEA) e aprovados pelo Comitê de ética em Pesquisa da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), sob o seguinte número de protocolo: 23115.005821/2012-92.

2.3.2 Infecção

Para os protocolos de infecção *in vivo*, foram utilizadas as linhagens de plasmódio murinho *Plasmodium berghei* ANKA, expressando proteína fluorescente verde (GFP)

constitutivamente (*P. berghei* ANKA-GFP (15cy1 clone)) [35,36]. As hemácias utilizadas para a infecção foram obtidas a partir da passagem *in vivo* em camundongos BALB/c quando a porcentagem de parasitemia atingiu aproximadamente 10%. 16 camundongos foram então inoculados com 10^4 de hemácias infectadas por essa espécie de *Plasmodium*. Em seguida, os animais foram randomicamente distribuídos em três grupos: grupo Controle (n = 5), grupo Cloroquina (n = 5) e grupo EBH (n = 6).

2.3.3 Tratamento terapêutico com EBH em malária murina

No 7º dia após infecção foram iniciados os tratamentos, sempre por via intraperitoneal (ip.), conforme a distribuição dos grupos a seguir: Controle: recebeu solução salina tamponada com fosfato (PBS); Cloroquina: recebeu 45mg/kg do fármaco e EBH: recebeu 5 mg/kg do extrato.

A parasitemia dos animais foi verificada por citometria de fluxo no 6º, 9º e 11º dias pós infecção [37]. A sobrevida dos animais foi acompanhada durante 21 dias e baseado nos dados da mortalidade desse período, foi calculada a mediana do tempo de sobrevida (MST) e a porcentagem do aumento da expectativa de vida (ILS), esta conforme a seguinte fórmula [38]:

$$\text{ILS (\%)} = \frac{(\text{MST do grupo tratado} - \text{MST do grupo controle})}{\text{MST do grupo controle}} \times 100$$

2.4 Análise estatística

Todas as análises foram realizadas com auxílio do software GraphPadPrism 5.0. Após constatada normalidade pelo teste D'Agostino-Pearson, as variáveis numéricas foram submetidas à análise da variância (ANOVA) seguida pelo pós-teste de Newman-Keuls ou a two-way ANOVA. Para os dados de sobrevida, foi utilizada a curva de Kaplan-Meier e o teste de Log-Rank para análise estatística. A concentração inibitória do crescimento parasitário (CI₅₀) foi calculada por regressão não-linear. O nível de significância para rejeição da hipótese de nulidade foi de 5% (p<0,05).

3. RESULTADOS

3.1 O EBH apresenta afinidade de ligação com as proteínas totais de hemácias infectadas por *P. falciparum* W2

A análise da interação molecular entre proteínas totais de hemácias infectadas por *P. falciparum* W2 tanto com EBH quanto com cloroquina (CQ) foi avaliada por meio da curva de associação no ensaio de RPS. Os resultados mostraram que, em todas as concentrações analisadas (25 a 100 $\mu\text{g/mL}$), o extrato apresentou maior afinidade de ligação do que a cloroquina, variando de 1,9 a 4,3 vezes mais, quando consideramos as unidades de ressonância (UR) (Figura 1).

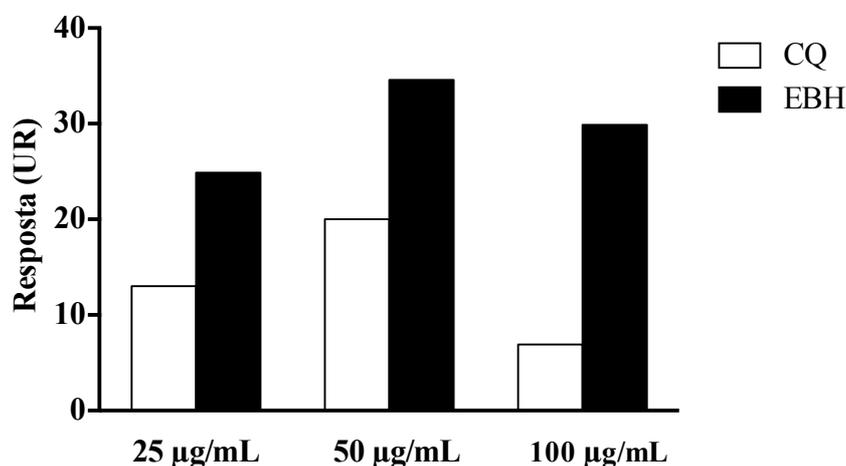


Figura 1. Interação molecular por ressonância plasmônica de superfície - RPS entre proteínas totais de hemácias infectadas por *P. falciparum* W2 e o extrato bruto hidroalcoólico de *C. ambrosioides* - EBH. Foi realizada a dosagem das proteínas totais de hemácias infectadas por *P. falciparum* W2 pelo método de Bradford para obtenção de concentração específica (150 $\mu\text{g/mL}$). O extrato (ligante) foi imobilizado em sensorchips tipo CM-5 para as análises da interação molecular por RPS com diferentes concentrações (25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$) da cloroquina (CQ) e do EBH. As análises de interação molecular via RPS foram desenvolvidas em sistema Biacore modelo T200 da GELifeScience. UR = unidade de ressonância.

3.2 O EBH apresenta efeito antiplasmódico *in vitro*

Para testar o efeito antimalárico *in vitro* do EBH, clones de *P. falciparum* 3D7 foram cultivados na ausência e presença de concentrações crescentes do extrato (Figura 2). O extrato inibiu o crescimento dos parasitos de forma dose-dependente do, com CI_{50} de 25,4 $\mu\text{g/mL}$.

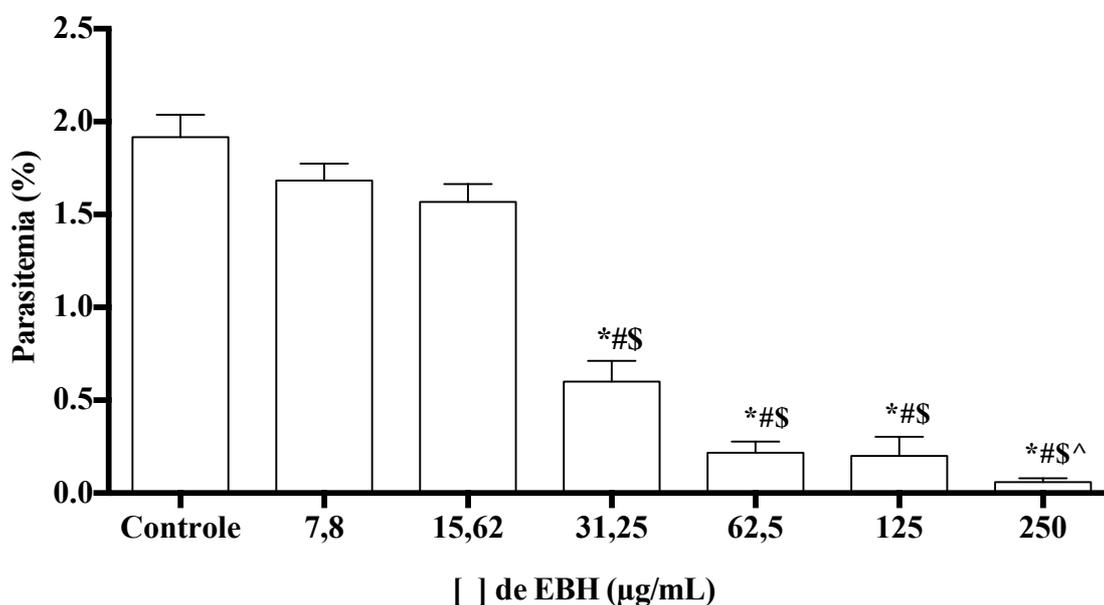


Figura 2. Efeito do tratamento *in vitro* com o extrato bruto hidroalcoólico de *C. ambrodioides* - EBH no crescimento de *P. falciparum* 3D7. Foi avaliada a inibição do crescimento do parasita após tratamento com EBH em diferentes concentrações (250, 125, 32,5, 62,5, 31,25, 15,62 e 7,8 µg/mL), em culturas de 48h. As parasitemias foram quantificadas por citometria de fluxo. As barras representam as médias ± DP dos grupos. (*) $p < 0,05$ em relação ao controle; (#) em relação à concentração de 7,8 µg/mL; (\$) em relação à de 15,62 µg/mL; (^) em relação à de 31,25 µg/mL.

3.3 O tratamento terapêutico com EBH é capaz de aumentar a sobrevida e reduzir a parasitemia na malária murina

A sobrevida dos animais do grupo EBH foi maior do que a do grupo Controle, porém menor do que o grupo CQ, pois o tratamento com esta droga manteve 100% de sobrevida até o último dia de avaliação (Figura 3). Quando foi comparada a mediana do tempo de sobrevida (MST) entre os grupos EBH e Controle, foi verificado que o tratamento com o extrato aumentou a expectativa de vida (ILS) dos animais em 33% (Tabela 1).

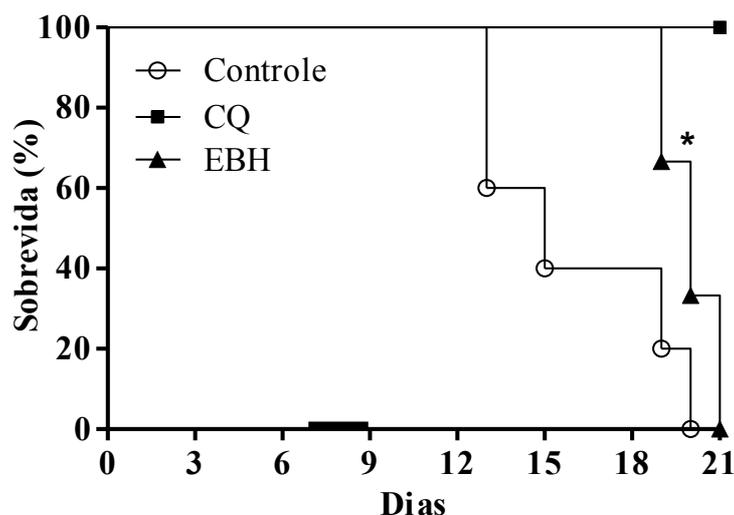


Figura 3. Sobrevivência de camundongos infectados com *P. berghei* ANKA-GFP e tratados com o extrato bruto hidroalcoólico de *C. ambrosioides* - EBH. Fêmeas BALB/c infectadas ip. com 10^4 de inóculo de plasmódio foram tratadas ip. a partir 7º dia pós infecção com PBS – controle (n = 5), cloroquina - CQ (45 mg/kg; n = 5) ou EBH (5 mg/kg; n = 6) durante 3 dias consecutivos (barra horizontal). A sobrevivência foi avaliada até o 21º dia após o inóculo. (*) $p < 0,05$ em relação ao controle.

Tabela 1. Avaliação da sobrevivência de camundongos infectados com *P. berghei* ANKA-GFP e tratados ip. durante 3 dias consecutivos com EBH a partir do 7º dia pós infecção.

Tratamento	MST (dias)	ILS (%)
Controle	15	-
CQ (45 mg/kg)*	-	-
EBH (5 mg/kg)	20	33

*Os animais tratados com CQ tiveram 100% de sobrevivência até o último dia de acompanhamento.

No 6º dia pós infecção, ou seja, 1 dia antes do início do tratamento, os camundongos infectados com *P. berghei* ANKA-GFP tiveram cargas parasitárias similares, considerando todos os grupos. Já no 9º dia após infecção, tempo correspondente ao terceiro e último tratamento), a parasitemia do grupo EBH foi similar à do grupo Controle, porém cerca de 6 vezes maior do que o grupo Cloroquina (CQ). No 11º dia, ou seja, 2 dias após o último tratamento e 2 antes da morte dos primeiros animais, enquanto a parasitemia do grupo Controle praticamente dobrou, no grupo EBH a parasitemia manteve-se muito próxima dos valores detectados no 9º dia, e portanto 53% menor do que a do Controle. A carga parasitária do grupo CQ, por sua vez, foi indetectável nesse último dia de avaliação (Figura 4).

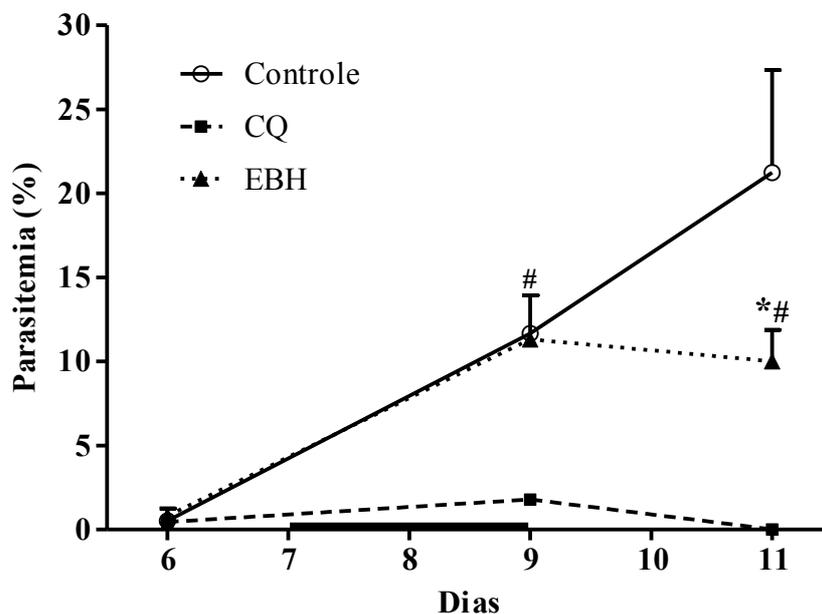


Figura 4. Efeito do tratamento com o extrato bruto hidroalcoólico de *C. ambrosioides* - EBH na parasitemia de camundongos infectados com *P. berghei* ANKA-GFP. Fêmeas BALB/c infectadas ip. com 10^4 de inóculo de plasmódio foram tratadas ip. a partir 7º dia pós infecção com PBS – controle (n = 5), cloroquina - CQ (45 mg/kg; n = 5) ou EBH (5 mg/kg; n = 6) durante 3 dias consecutivos (barra horizontal). A parasitemia foi avaliada no 6º, 9º e 11º dias pós infecção por citometria de fluxo. As barras representam as médias \pm DP dos grupos. (*) $p < 0,05$ em relação ao controle; (#) em relação à CQ.

4. DISCUSSÃO

A necessidade de alternativas terapêuticas para o tratamento da malária é emergente, devido à documentada resistência do parasito aos antimaláricos atuais e ao grande impacto mundial que a doença possui [2,9,39]. Nesse sentido, o presente estudo mostrou que o extrato bruto hidroalcoólico das folhas de *C. ambrosioides* possui significativo potencial antiplasmódico em diferentes modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*.

A ressonância plasmônica de superfície (RPS) representa um biossensor tecnológico de grande valia para o *screening* de novas drogas [40], otimizando tempo e custo na avaliação farmacológica de vários candidatos terapêuticos [41]. Assim, primeiramente, foi investigado o potencial de ligação molecular entre o EBH e as proteínas totais das hemácias infectadas pela cepa W2 de *P. falciparum*, em comparação à ligação desempenhada pela cloroquina. Os resultados mostraram que, nas três concentrações testadas, houve maior afinidade de ligação entre o EBH e o extrato proteico de hemácias infectadas, quando comparado à cloroquina (até

4,3 vezes mais) (Figura 1). Assim, o EBH foi considerado um candidato terapêutico com boa afinidade pelo alvo molecular, ou seja, hemácias infectadas por *P. falciparum* W2.

Cabe ressaltar que não foram encontrados relatos prévios que avaliassem a afinidade por RPS entre um extrato vegetal e *Plasmodium falciparum*, o que torna esses achados especialmente relevantes. Além disso, a utilização da cloroquina, neste ensaio, constituiu-se primariamente como um parâmetro comparativo, pois a afinidade dessa droga às proteínas totais de hemácias infectadas não está necessariamente relacionada à sua eficácia terapêutica, o que pode justificar a sua baixa ligação ao alvo molecular investigado. A cloroquina age difundindo-se pela membrana do vacúolo digestivo de *Plasmodium*, impedindo a subsequente polimerização da protoporfirina IX, o que resulta no acúmulo desta molécula e na morte do parasito por toxicidade e dano oxidativo em suas membranas [42–44].

Assim, com o objetivo de avaliar se a afinidade de ligação molecular do EBH frente às hemácias infectadas se correlacionaria com a atividade antiplasmódica, foi investigado o efeito do tratamento *in vitro* do EBH sobre culturas de *P. falciparum* 3D7. O EBH apresentou efeito inibitório sobre o crescimento parasitário, de forma dose-dependente (Figura 2), com CI_{50} de 25,4 $\mu\text{g/mL}$.

Para confrontar a atividade plasmodicida *in vitro* do EBH com a de outras espécies vegetais, comparamos a CI_{50} obtida para o extrato com a classificação adotada em artigos anteriores que avaliaram o potencial antimalárico *in vitro* de produtos naturais derivados de plantas [13,45–47]. Nessa classificação, extratos e constituintes vegetais com $CI_{50} < 10 \mu\text{g/mL}$ possuem boa atividade; CI_{50} entre 10-50 $\mu\text{g/mL}$, moderada atividade; CI_{50} entre 50-100 $\mu\text{g/mL}$, baixa atividade e $CI_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$, inatividade. Desta forma, a CI_{50} obtida neste estudo mostra uma moderada atividade plasmodicida do EBH.

A CI_{50} do EBH aqui mostrada para *P. falciparum* 3D7 foi inclusive menor do que a encontrada pelo nosso grupo de pesquisa testando a ação antimicrobiana desse extrato frente a outros protozoários *in vitro*. Bezerra et al. [26] encontraram uma CI_{50} de 151,9 $\mu\text{g/mL}$ para o mesmo extrato contra as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*. Já analisando, por sua vez, o efeito anti-giardia do EBH, Neiva et al. [21] encontraram uma CI_{50} de 198,18 $\mu\text{g/mL}$ para o EBH obtido por percolação e de 77,28 $\mu\text{g/mL}$ para o obtido por maceração contra trofozoítos de *Giardia lamblia*.

Dentre os constituintes presentes no EBH que possivelmente podem justificar essa atividade antiplasmódica, destaca-se o ascaridol. Além de já ter sido isolado do óleo essencial da espécie *C. ambrosioides* [48,49], esse composto também já foi encontrado no extrato etanólico das folhas e caules dessa espécie vegetal [50], bem como na fração hexânica do

extrato aquoso das folhas, flores e caule da planta [49], o que sugere a presença desse terpeno também no EBH.

Pollack et al. [30] descreveram que o ascaridol, isolado do óleo essencial de *C. ambrosioides*, inibiu eficazmente o crescimento de plasmódios *in vitro*. Além disso, esses pesquisadores verificaram que a presença do grupo peróxido na estrutura química do ascaridol foi diretamente associada à sua atividade antiparasitária, pois, a utilização de cineol, o qual possui o grupo epóxido exterior ao anel em vez de endoperóxido, nas mesmas concentrações, não foi capaz de inibir o crescimento parasitário. Tais resultados tomam maior destaque pois a presença do grupo peróxido é essencial ao mecanismo de ação da artemisinina [39,51,52], composto que tem, atualmente, grande importância no tratamento da malária [2].

Mais recentemente, Monzote et al. [29] expuseram a atividade *in vitro* do óleo essencial de *C. ambrosioides* contra *P. falciparum* e outros protozoários. Esses pesquisadores também ressaltaram a importância do ascaridol como um constituinte ligado a essa atividade antimicrobiana.

Com base na eficácia do EBH *in vitro* contra *P. falciparum* 3D7, foi então investigado o efeito do tratamento *in vivo* com o mesmo extrato sobre a sobrevivência e a parasitemia na malária murina. O modelo *in vivo* utilizado neste trabalho foi apropriado para a análise desses aspectos, uma vez que já é descrito na literatura que camundongos Balb/c infectados por *P. berghei* ANKA tendem a possuir um padrão de resistência ao desenvolvimento de malária grave (cerebral), morrendo mais tardiamente por anemia e altas cargas parasitárias [53,54]. Além disso, uma vez que o tratamento só foi iniciado quando todos os animais já tinham parasitemia detectável, o que ocorreu no 7º dia pós infecção (Figura 4), foi avaliada a ação terapêutica do EBH frente à malária.

Nesse sentido, foi constatado um aumento na sobrevivência dos animais tratados com EBH em relação ao controle (Figura 3), o que correspondeu a aumento de 33% na expectativa de vida (Tabela 1). Os animais tratados com cloroquina, por sua vez, mantiveram-se vivos até o final do seguimento. Concomitantemente, o tratamento com o extrato foi capaz de diminuir a carga parasitária em 53% em relação ao controle no 11º dia pós infecção (Figura 4). Assim, apesar de não ter inibido totalmente a parasitemia como a cloroquina, o tratamento com o EBH foi capaz de limitar a proliferação dos protozoários até mesmo 48 horas após a última dose terapêutica.

Apesar de, até nosso conhecimento, não haver trabalhos que avaliem o potencial antimalárico de *C. ambrosioides* *in vivo*, confrontamos os resultados aqui apresentados com aqueles encontrados por Hilou, Nacoulma e Guiguemde [55], os quais mostraram que o

extrato de *Amaranthus spinosus*, também da família Amaranthaceae, somente foi capaz de suprimir a parasitemia dos animais infectados em aproximadamente 53,1% com a dose de 900 mg/kg. Outros trabalhos, avaliando o potencial antimalárico *in vivo* de diferentes espécies vegetais, utilizaram doses 20 a 100 vezes maiores do que a utilizada no presente estudo para o EBH [56–58]. Essas evidências mostram um efeito antiparasitário do EBH mesmo em baixas doses e, concomitantemente, sugerem que doses maiores, ou até mesmo uma maior duração do tratamento, poderiam potencializar sua atividade antiplasmódica, hipótese a ser testada.

É importante considerar que o aumento da sobrevida aqui detectado pode ter sido um resultado direto da ação plasmodicida do EBH, o que foi visto tanto *in vitro* quanto *in vivo* neste trabalho. Para reforçar isso, trabalhos prévios, em modelo de malária cerebral, destacam a importância da diminuição da carga parasitária para o aumento da sobrevida dos animais infectados [53,54].

Por outro lado, é válido ponderar que modelos experimentais *in vivo* também levam em consideração a participação do sistema imune no controle da infecção [59]. Em relação a isso, trabalhos do nosso grupo de pesquisa têm mostrado que o EBH possui significativo efeito imunomodulador em camundongos, tanto na ausência quanto na presença de infecção parasitária [23,28]. Assim, é razoável sugerir que a modulação do sistema imune também pode ter tido importante papel no aumento da sobrevida e na redução da carga parasitária aqui apresentados.

Ademais, o fato de já ter sido relatado o efeito anti-inflamatório e analgésico de *C. ambrosioides* [27,50] corrobora o potencial dessa espécie vegetal. Wright [14], discorrendo sobre o desenvolvimento de antimaláricos derivados de plantas, destacou que essas novas ferramentas terapêuticas também podem ser importantes para reduzir sintomas característico dessa infecção parasitária, tais como dor e febre.

5. CONCLUSÕES

O presente estudo demonstrou pela primeira vez a afinidade de ligação do extrato hidroalcoólico de *C. ambrosioides* às proteínas totais de hemácias infectadas por *Plasmodium falciparum*, bem como sua atividade antiplasmódica *in vitro*. Além disso, o efeito antiparasitário do EBH também foi constatado *in vivo*, considerando o aumento da sobrevida e a diminuição da parasitemia nos animais tratados com o extrato. Os resultados conjuntamente mostram que o EBH pode ser utilizado como uma alternativa terapêutica para o desenvolvimento de novos antimaláricos.

Potencial Conflito de Interesses

Nenhum dos autores relata conflito de interesses.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde (PDTIS – FIOCRUZ) pelo uso de suas instalações, bem como às agências de fomento: FAPEMA, FAPESP, CNPq e CAPES.

REFERÊNCIAS

- 1 Liu J, Modrek S, Gosling RD, Feachem RGA. Malaria eradication: is it possible? Is it worth it? Should we do it? *Lancet Glob Heal* 2013;1:e2–3.
- 2 WHO. World malaria report 2014. Geneva: World Health Organization, 2014.
- 3 Kantele A, Jokiranta TS. Review of cases with the emerging fifth human malaria parasite, *Plasmodium knowlesi*. *Clin Infect Dis* 2011;52(11):1356–1362.
- 4 Nosten F, White NJ. Artemisinin-based combination treatment of falciparum malaria. *Am J Trop Med Hyg* 2007;77:181–192.
- 5 Wells TNC, Alonso PL, Gutteridge WE. New medicines to improve control and contribute to the eradication of malaria. *Nat Rev Drug Discov* 2009;8(11):879–891.
- 6 Foley M, Tilley L. Quinoline antimalarials: Mechanisms of action and resistance. *Int J Parasitol* 1997;27(2):231–240.
- 7 Mojab F. Antimalarial natural products: a review. *Avicenna J phytomedicine* 2012;2(2):52–62.
- 8 Hyde JE. Mechanisms of resistance of *Plasmodium falciparum* to antimalarial drugs. *Microbes Infect* 2002;4(2):165–174.
- 9 Juge N, Moriyama S, Miyaji T, Kawakami M, Iwai H, Fukui T, et al. *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter is a H⁺-coupled polyspecific nutrient and drug exporter. *Proc Natl Acad Sci* 2015;112(11):3356–3361.
- 10 Wellems TE, Plowe CV. Chloroquine-resistant malaria. *J Infect Dis* 2001;184(6):770–776.
- 11 WHO. Emergency response to artemisinin resistance in the Greater Mekong subregion: regional framework for action 2013-2015. Geneva: World Health Organization, 2013.
- 12 Oliveira AB, Dolabela MF, Braga FC, Jácome RL, Varotti FP, Pávoa MM. Plant-derived antimalarial agents: New leads and efficient phythomedicines. Part I. alkaloids. *An Acad Bras Cienc* 2009;81(4):715–740.
- 13 Batista R, De Jesus Silva Júnior A, De Oliveira AB. Plant-derived antimalarial agents: New leads and efficient phythomedicines. part II. non-alkaloidal natural products. *Molecules* 2009;14(80):3037–3072.
- 14 Wright CW. Plant derived antimalarial agents: New leads and challenges. *Phytochem Rev* 2005;4(1):55–61.
- 15 Saxena S, Pant N, Jain DC, Bhakuni RS. Antimalarial agents from plant sources. *Curr Sci* 2003;85(9):1314–1329.

- 16 BRASIL. Ministério da Saúde. RENISUS - Relação Nacional de Plantas Mediciniais de Interesse ao SUS. Espécies vegetais. DAF/SCTIE/MS - RENISUS - fev/2009. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/sus/pdf/marco/ms_relacao_plantas_mediciniais_sus_0603.pdf. Acesso: 21 de junho de 2015.
- 17 França F, Lago EL, Marsden PD. Plants used in the treatment of leishmanial ulcers due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* in an endemic area of Bahia, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 1996;29(3):229–232.
- 18 Conway GA, Slocumb JC. Plants used as abortifacients and emmenagogues by Spanish New Mexicans. *J Ethnopharmacol* 1979;1(3):241–261.
- 19 Kliks MM. Studies on the traditional herbal anthelmintic *Chenopodium ambrosioides* L.: ethnopharmacological evaluation and clinical field trials. *Soc Sci Med* 1985;21(8):879-886.
- 20 Di Stasi LC, Hiruma-Lima CA. Espécies medicinais da família Chenopodiaceae. *Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica*. 2nd ed. São Paulo: UNESP 2002.
- 21 Neiva VA, Ribeiro MNS, Nascimento FRF, Cartágenes MSS, Coutinho-Moraes DF, Amaral FMM. Plant species used in giardiasis treatment: Ethnopharmacology and in vitro evaluation of anti-Giardia activity. *Brazilian J Pharmacogn* 2014;24(2):215–224.
- 22 Nascimento FRF, Cruz GVB, Pereira PVS, Maciel MC, Silva LA, Azevedo AP, et al. Ascitic and solid Ehrlich tumor inhibition by *Chenopodium ambrosioides* L. treatment. *Life Sci* 2006;78(22):2650–2653.
- 23 Patrício FJ, Costa GC, Pereira PVS, Aragão-Filho WC, Sousa SM, Frazão JB, et al. Efficacy of the intralesional treatment with *Chenopodium ambrosioides* in the murine infection by *Leishmania amazonensis*. *J Ethnopharmacol* 2008;115(2):313–319.
- 24 Lima-Junior JAC, Costa GC, Reis AS, Bezerra JL, Patrício FJB, Silva LA, et al. Inibição da infecção *in vitro* de macrófagos por *Leishmania amazonensis* por extrato e frações de *Chenopodium ambrosioides*. *Rev Ciências da Saúde* 2014;16(1):46–53.
- 25 Reis AS, Rios CEP, Melo LP, Costa GC, Silva LA, Patrício FJB, et al. Atividade leishmanicida *in vitro* de frações do extrato hidroalcoólico das folhas de *Chenopodium ambrosioides* L. *Rev Ciências da Saúde* 2012;14(2):119–126.
- 26 Bezerra JL, Costa GC, Lopes TC, Carvalho ICDS, Patrício FJ, Sousa SM, et al. Avaliação da atividade leishmanicida *in vitro* de plantas medicinais. *Brazilian J Pharmacogn* 2006;16:631–637.
- 27 Sousa LHA, Rios CEP, Assunção AKM, Fialho EMS, Costa GC, Nascimento FRF. Avaliação da ação analgésica do extrato hidroalcoólico das folhas de *Chenopodium ambrosioides* L. em ensaios pré-clínicos. *Rev Ciências da Saúde* 2012;14(1):73–82.

- 28 Cruz GVB, Pereira PVS, Patrício FJ, Costa GC, Sousa SM, Frazão JB, et al. Increase of cellular recruitment, phagocytosis ability and nitric oxide production induced by hydroalcoholic extract from *Chenopodium ambrosioides* leaves. *J Ethnopharmacol* 2007;111(1):148–154.
- 29 Monzote L, García M, Pastor J, Gil L, Scull R, Maes L, et al. Essential oil from *Chenopodium ambrosioides* and main components: Activity against *Leishmania*, their mitochondria and other microorganisms. *Exp Parasitol* 2014;136:20–26.
- 30 Pollack Y, Segal R, Golenser J. The effect of ascaridole on the *in vitro* development of *Plasmodium falciparum*. *Parasitol Res* 1990;76(7):570–572.
- 31 Neiva VS, Ribeiro MNS, Cartágenes MSS, Moraes-Coutinho DF, Nascimento FRF, Reis AS, et al. Estudos pré-clínicos de atividade giardicida de *Chenopodium ambrosioides* L. e a padronização dos extratos na pesquisa e desenvolvimento de fitoterápicos. *Rev Ciências da Saúde* 2011;13(2):155–165.
- 32 Trager W, Jensen JB. Human malaria parasites in continuous culture. *Science* 1976;193:673–675.
- 33 Lambros C, Vanderberg JP. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *J Parasitol* 1979;65(3):418–420.
- 34 Jordão FM, Saito AY, Miguel DC, de Jesus Peres V, Kimura EA, Katzin AM. *In vitro* and *in vivo* antiplasmodial activities of risedronate and its interference with protein prenylation in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55(5):2026–2031.
- 35 Janse CJ, Franke-Fayard B, Waters AP. Selection by flow-sorting of genetically transformed, GFP-expressing blood stages of the rodent malaria parasite, *Plasmodium berghei*. *Nat Protoc* 2006;1(2):614–623.
- 36 Janse CJ, Franke-Fayard B, Mair GR, Ramesar J, Thiel C, Engelmann S, et al. High efficiency transfection of *Plasmodium berghei* facilitates novel selection procedures. *Mol Biochem Parasitol* 2006;145(1):60–70.
- 37 Janse CJ, Van Vianen PH. Flow cytometry in malaria detection. *Methods Cell Biol* 1994;42:295–318.
- 38 Gupta M, Mazumder UK, Rath N, Mukhopadhyay DK. Antitumor activity of methanolic extract of *Cassia fistula* L. seed against Ehrlich ascites carcinoma. *J Ethnopharmacol* 2000;72(1-2):151–156.
- 39 Krishna S, Uhlemann AC, Haynes RK. Artemisinins: Mechanisms of action and potential for resistance. *Drug Resist Updat* 2004;7(4-5):233–244.
- 40 Patching SG. Surface plasmon resonance spectroscopy for characterisation of membrane protein-ligand interactions and its potential for drug discovery. *Biochim Biophys Acta* 2014;1838:43–55.

- 41 Myszka DG, Rich RL. Implementing surface plasmon resonance biosensors in drug discovery. *Pharm Sci Technol Today* 2000;3:310–317.
- 42 Vippagunta SR, Dorn A, Matile H, Bhattacharjee AK, Karle JM, Ellis WY, et al. Structural specificity of chloroquine-hematin binding related to inhibition of hematin polymerization and parasite growth. *J Med Chem* 1999;42(22):4630–4639.
- 43 Sullivan DJ Jr, Gluzman IY, Russell DG, Goldberg DE. On the molecular mechanism of chloroquine's antimalarial action. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93(21):11865–11870.
- 44 Fitch CD. Ferriprotoporphyrin IX, phospholipids, and the antimalarial actions of quinoline drugs. *Life Sci* 2004;74(16):1957–1972.
- 45 Basco LK, Mitaku S, Skaltsounis AL, Ravelomanantsoa N, Tillequin F, Koch M, et al. *In vitro* activities of furoquinoline and acridone alkaloids against *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38(5):1169–1171.
- 46 Dolabela MF, Oliveira SG, Nascimento JM, Peres JM, Wagner H, Póvoa MM, et al. *In vitro* antiplasmodial activity of extract and constituents from *Esenbeckia febrifuga*, a plant traditionally used to treat malaria in the Brazilian Amazon. *Phytomedicine* 2008;15(5):367–372.
- 47 Osorio E, Arango GJ, Jiménez N, Alzate F, Ruiz G, Gutiérrez D, et al. Antiprotozoal and cytotoxic activities in vitro of *Colombian Annonaceae*. *J Ethnopharmacol* 2007;111(3):630–635.
- 48 Monzote L1, Montalvo AM, Almanonni S, Scull R, Miranda M, Abreu J. Activity of the essential oil from *Chenopodium ambrosioides* grown in Cuba against *Leishmania amazonensis*. *Chemotherapy* 2006;52(3):130–136.
- 49 MacDonald D, VanCrey K, Harrison P, Rangachari PK, Rosenfeld J, Warren C, et al. Ascaridole-less infusions of *Chenopodium ambrosioides* contain a nematocide(s) that is(are) not toxic to mammalian smooth muscle. *J Ethnopharmacol* 2004;92(2-3):215–221.
- 50 TrivellatoGrassi L, Malheiros A, Meyre-Silva C, Buss ZS, Monguilhott ED, Fröde TS, et al. From popular use to pharmacological validation: A study of the anti-inflammatory, anti-nociceptive and healing effects of *Chenopodium ambrosioides* extract. *J Ethnopharmacol* 2013;145(1):127–138.
- 51 Haynes RK, Krishna S. Artemisinin: Activities and actions. *Microbes Infect* 2004;6(14):1339–1346.
- 52 Cui L, Su X. Discovery, mechanisms of action and combination therapy of artemisinin. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2009;7(8):999–1013.
- 53 Hanum SP, Hayano M, Kojima S. Cytokine and chemokine responses in a cerebral malaria-susceptible or -resistant strain of mice to *Plasmodium berghei* ANKA infection: early chemokine expression in the brain. *Int Immunol* 2003;15(5):633–640.

- 54 Moumaris M, Sestier C, Miltgen F, Halbreich A, Gentilini M, Sabolovic D. Effect of fatty acid treatment in cerebral malaria-susceptible and nonsusceptible strains of mice. *J Parasitol* 1995;81(6):997–999.
- 55 Hilou A, Nacoulma OG, Guiguemde TR. In vivo antimalarial activities of extracts from *Amaranthus spinosus* L. and *Boerhaavia erecta* L. in mice. *J Ethnopharmacol* 2006;103(2):236–240.
- 56 Bantie L, Assefa S, Teklehaimanot T, Engidawork E. In vivo antimalarial activity of the crude leaf extract and solvent fractions of *Croton macrostachyus* Hoesht. (Euphorbiaceae) against *Plasmodium berghei* in mice. *BMC Complement Altern Med* 2014;14:79.
- 57 Muñoz V, Sauvain M, Bourdy G, Callapa J, Bergeron S, Rojas I, et al. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. Part I. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by the Chacobo Indians. *J Ethnopharmacol* 2000;69(2):127–137.
- 58 Deharo E, Bourdy G, Quenevo C, Muñoz V, Ruiz G, Sauvain M. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. Part V. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by the Tacana Indians. *J Ethnopharmacol* 2001;77(1):91–98.
- 59 Waako PJ, Gumede B, Smith P, Folb PI. The in vitro and in vivo antimalarial activity of *Cardiospermum halicacabum* L. and *Momordica foetida* Schumch. Et Thonn. *J Ethnopharmacol* 2005;99(1):137–143.

ANEXO A - APROVAÇÃO EM COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO	
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL	
PARECER CONSUBSTANCIADO INICIAL	Nº do parecer: 21
PROJETO DE PESQUISA: Avaliação do potencial profilático e terapêutico de produtos naturais contra agentes infecciosos: uma abordagem imunológica, parasitológica e microbiológica.	Registro do CEUA: 21/2012
	Nº do Protocolo: 23115.005821/2012-92
	Data de entrada no CEUA: 30/04/2012
	Parecer: Aprovado com recomendações

I – Identificação

Título do projeto: "Avaliação do potencial profilático e terapêutico de produtos naturais contra agentes infecciosos: uma abordagem imunológica, parasitológica e microbiológica"		
Identificação da equipe executora: Flávia Raquel Fernandes do Nascimento (coordenador); Valério Monteiro Neto (UNICEUMA) Regina Maria D'Amparo Lima (USP) Ana Lucia Abreu Silva (UEMA) Momtchilo Russo (USP)		
Instituição onde será realizado: Universidade Federal do Maranhão (UFMA); Centro Universitário do Maranhão (UNICEUMA); Universidade Estadual do Maranhão (UEMA); Universidade de São Paulo (USP)		
Área temática:	Multicêntrico:	Data de recebimento:
Biológicas	Sim:	30/04/2012
Cooperação estrangeira:		Data de devolução
Não		08/06/2012

II – Objetivos:

GERAL: Desenvolver bioprodutos derivados de produtos naturais com potencial antileishmanial, antimalárico, antibacteriano e capazes de neutralizar a virulência considerando os aspectos etnobotânicos, etnofarmacológicos e imunofarmacológicos.

ESPECÍFICO:

Realizar investigação etnobotânica e etnofarmacológica de produtos naturais usados para o tratamento de leishmaniose, malária e infecções bacterianas;

ANEXO B - INFORMAÇÕES AOS AUTORES

Journal title

Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine

Submission

Manuscripts should be submitted by one of the authors of the manuscript through the online Manuscript Tracking System. Regardless of the source of the word-processing tool, only electronic PDF (.pdf) or Word (.doc, .docx, .rtf) files can be submitted through the MTS. There is no page limit. Only online submissions are accepted to facilitate rapid publication and minimize administrative costs. Submissions by anyone other than one of the authors will not be accepted. The submitting author takes responsibility for the paper during submission and peer review. If for some technical reason submission through the MTS is not possible, the author can contact ecam@hindawi.com for support.

Terms of Submission

Papers must be submitted on the understanding that they have not been published elsewhere and are not currently under consideration by another journal published by Hindawi or any other publisher. The submitting author is responsible for ensuring that the article's publication has been approved by all the other coauthors. It is also the authors' responsibility to ensure that the articles emanating from a particular institution are submitted with the approval of the necessary institution. Only an acknowledgment from the editorial office officially establishes the date of receipt. Further correspondence and proofs will be sent to the author(s) before publication unless otherwise indicated. It is a condition of submission of a paper that the authors permit editing of the paper for readability. All inquiries concerning the publication of accepted papers should be addressed to ecam@hindawi.com.

Peer Review

All manuscripts are subject to peer review and are expected to meet standards of academic excellence. If approved by the editor, submissions will be considered by peer-reviewers, whose identities will remain anonymous to the authors.

Concurrent Submissions

In order to ensure sufficient diversity within the authorship of the journal, authors will be limited to having two manuscripts under review at any point in time. If an author already has two manuscripts under review in the journal, he or she will need to wait until the review process of at least one of these manuscripts is complete before submitting another manuscript for consideration. This policy does not apply to Editorials or other non-peer reviewed manuscript types.

Article Processing Charges

Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine is an open access journal. Open access charges allow publishers to make the published material available for free to all interested online visitors. For more details about the article processing charges of Evidence-

Based Complementary and Alternative Medicine, please visit the Article Processing Charges information page.

Units of Measurement

Units of measurement should be presented simply and concisely using System International (SI) units.

Title and Authorship Information

The following information should be included

Paper title

Full author names

Full institutional mailing addresses

Email addresses

Abstract

The manuscript should contain an abstract. The abstract should be self-contained and citation-free and should not exceed 200 words.

Introduction

This section should be succinct, with no subheadings.

Materials and Methods

This part should contain sufficient detail so that all procedures can be repeated. It can be divided into subsections if several methods are described.

Results and Discussion

This section may each be divided by subheadings or may be combined.

Conclusions

This should clearly explain the main conclusions of the work highlighting its importance and relevance.

Acknowledgments

All acknowledgments (if any) should be included at the very end of the paper before the references and may include supporting grants, presentations, and so forth.

References

Authors are responsible for ensuring that the information in each reference is complete and accurate. All references must be numbered consecutively and citations of references in text

should be identified using numbers in square brackets (e.g., “as discussed by Smith [9]”; “as discussed elsewhere [9, 10]”). All references should be cited within the text; otherwise, these references will be automatically removed.

Preparation of Figures

Upon submission of an article, authors are supposed to include all figures and tables in the PDF file of the manuscript. Figures and tables should not be submitted in separate files. If the article is accepted, authors will be asked to provide the source files of the figures. Each figure should be supplied in a separate electronic file. All figures should be cited in the paper in a consecutive order. Figures should be supplied in either vector art formats (Illustrator, EPS, WMF, FreeHand, CorelDraw, PowerPoint, Excel, etc.) or bitmap formats (Photoshop, TIFF, GIF, JPEG, etc.). Bitmap images should be of 300 dpi resolution at least unless the resolution is intentionally set to a lower level for scientific reasons. If a bitmap image has labels, the image and labels should be embedded in separate layers.

Preparation of Tables

Tables should be cited consecutively in the text. Every table must have a descriptive title and if numerical measurements are given, the units should be included in the column heading. Vertical rules should not be used.

Proofs

Corrected proofs must be returned to the publisher within 2-3 days of receipt. The publisher will do everything possible to ensure prompt publication. It will therefore be appreciated if the manuscripts and figures conform from the outset to the style of the journal.

Copyright

Open Access authors retain the copyrights of their papers, and all open access articles are distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium, provided that the original work is properly cited.

The use of general descriptive names, trade names, trademarks, and so forth in this publication, even if not specifically identified, does not imply that these names are not protected by the relevant laws and regulations.

While the advice and information in this journal are believed to be true and accurate on the date of its going to press, neither the authors, the editors, nor the publisher can accept any legal responsibility for any errors or omissions that may be made. The publisher makes no warranty, express or implied, with respect to the material contained herein.

Disclosure Policy

A competing interest exists when professional judgment concerning the validity of research is influenced by a secondary interest, such as financial gain. We require that our authors reveal any possible conflict of interest in their submitted manuscripts.

If there is no conflict of interest, authors should state that “The author(s) declare(s) that there is no conflict of interest regarding the publication of this paper.”