

EFEITO DE *MOMORDICA CHARANTIA* L. EM CAMUNDONGOS INFECTADOS POR *PLASMODIUM BERGHEI*

Helene Mariko Ueno, Julio T. Doyama, Carlos Roberto
Padovani e Ednir Salata

A Organização Mundial de Saúde (OMS) citou a malária como um dos principais problemas de saúde no Brasil e no terceiro mundo, onde 80% da população recorre à medicina tradicional (popular) para sanar vários problemas de assistência médica primária. No que se refere à malária, seu tratamento e controle têm sido dificultados devido às cepas resistentes às drogas comumente utilizadas. Isso torna urgente a busca de novas drogas antimaláricas. Sabe-se que a população utiliza-se de diferentes plantas para o tratamento e cura de vários males, inclusive a malária. Neste trabalho nos propusemos reavaliar o efeito de Momordica charantia L. (Cucurbitaceae) sobre camundongos infectados por Plasmodium berghei. A planta foi testada sob a forma de extratos aquoso e etanólico, na dose de 1000mg por kg de peso corpóreo do camundongo, ministrado por via oral, por cinco dias consecutivos da infecção (2ª ao 6ª). O efeito foi avaliado em função da parasitemia e da sobrevivência dos animais. Embora a população indique e utilize essa planta na malária humana, nos ensaios deste trabalho, nas condições do experimento, os extratos de M. charantia não apresentaram atividade satisfatória contra o P. berghei.

Palavras-chaves: Momordica. Plasmodium berghei. Antimalárico.

Por muitos anos, o quinino foi a droga de escolha para o tratamento da malária²⁷. Porém, na década de 30, este alcalóide encontrado na casca de *Cinchona* sp L. (Rubiaceae)^{8, 26}, foi sendo substituído por drogas sintéticas, como 8-aminoquinolinas (primaquina), 4-aminoquinolinas (cloroquina, amodiaquina) e inibidores da síntese do ácido fólico (pirimetamina, proguanil). Por volta dos anos 50, acreditava-se que a malária poderia ser erradicada em todo o mundo^{25, 26}, sendo que no Brasil chegou a ser controlada por volta da década de 50¹⁷.

Entretanto, nos últimos anos, a endemicidade da malária tem aumentado acentuadamente³³, devido às migrações populacionais incontroláveis¹⁹, à pequena vigilância epidemiológica, ao aparecimento de mosquitos resistentes aos inseticidas, à falta de recursos para o controle do vetor e ao surgimento de cepas resistentes

de *Plasmodium falciparum*^{10, 11, 28, 30} e do *P. vivax*^{3, 31} aos quimioterápicos usuais. Além da questão da resistência do parasito às drogas, Carvalho e cols⁷ chamam a atenção às reações adversas, como a neutropenia e agranulocitose severas, decorrentes da quimioprofilaxia antimalárica por amodiaquina e pirimetamina associada ao dapsona.

A busca de novos medicamentos pode ser feita através da síntese de novos compostos, modificação molecular de substâncias com atividade farmacológica descrita e a partir de produtos naturais, especialmente de espécies vegetais. Considerando-se compostos sintéticos, diversas drogas, contra cepas resistentes à cloroquina e multi-resistentes vêm sendo estudadas. A deferroxamina, um quelante de ferro, foi testada sem o sucesso desejado⁶. O uso de sulfa de meia vida curta associada ao proguanil foi indicado, já que as de meia vida longa podem trazer reações adversas sérias⁵. Também o uso de antibióticos inibidores da síntese protéica, como a eritromicina e azitromicina, foi indicado¹⁴. Novas drogas, como o fenantreno-metanol, halofantrine e hidroclorida estão sendo desenvolvidas com o intuito de controlar o fenômeno da resistência do *Plasmodium*¹².

Departamento de Parasitologia, de Química, de Bioestatística e de Parasitologia do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista/Campus de Botucatu, Botucatu, SP.

Endereço para correspondência: Dr. Ednir Salata. Departamento de Parasitologia, Pç. Rubião Junior, 18168-000 Botucatu, SP, Brasil. Fax: (014) 821-3744.

Recebido para publicação em 22/09/95.

Do ponto de vista de compostos de origem natural, a artemisinina foi isolada a partir de *Artemisia annua*. A artemisinina e vários de seus derivados possuem atividade antimalárica, sendo a droga de escolha no tratamento da malária cerebral e em pacientes que não respondem ao quinino (cloroquina-resistente)^{1 10 21 22}. Janse e cols¹⁵, estudaram a atividade da artemisinina e seus derivados contra *P. berghei* *in vivo* e *in vitro*.

Além da *Artemisia annua*, inúmeras espécies vegetais têm sido estudadas quanto suas atividades antimaláricas^{1 2 3 9 18} inclusive *Momordica charantia* cuja diminuição discreta de parasitemia foi relatada por Ornellas e cols²⁴ e Neves e cols²⁵. No entanto, um estudo com folhas e caules frescos, desta espécie, torna-se importante na reavaliação da diminuição da parasitemia em camundongos infectados por *P. berghei*.

MATERIAL E MÉTODOS

A atividade antimalárica de extratos de *Momordica charantia* foi avaliada pelo tratamento de camundongos infectados com *Plasmodium berghei*.

Após a identificação da planta pelo Dr. Luiz Roberto Hernandez Bicudo, do Departamento de Botânica do Instituto de Biociências da UNESP-Campus de Botucatu, folhas e caules frescos foram coletados e levados ao laboratório para o preparo de extratos aquoso e etanólico.

Extrato aquoso. Cerca de 200g da planta, já lavada, foram triturados em água e, após a remoção dos resíduos sólidos, o material foi centrifugado e o sobrenadante filtrado a vácuo. O extrato foi concentrado até 105mg/ml em estufa a 60°C. A determinação dessa concentração foi feita a partir do peso seco de alíquotas de 0,2ml em estufa a 80°C.

Extrato etanólico. Foi obtido do mesmo modo anterior, utilizando-se como solvente o etanol. A evaporação do solvente foi realizada em evaporador rotativo (rota-vapor), seguido de liofilização. O produto liofilizado foi dissolvido em água para se obter 105mg/ml de extrato.

Infecção e testes antimaláricos em camundongos. Camundongos swiss de 55 dias de idade, pesando em média 34g, machos, foram inoculados com 1×10^6 hemácias parasitadas por *P. berghei*, por via intraperitoneal.

Os camundongos foram separados em grupos de 10 animais e mantidos em caixa de contenção, com água e ração *ad libitum*, foto período de 12 horas, no Laboratório de Experimentação Animal do Departamento de Parasitologia.

Grupo I. Avaliação da parasitemia - grupo controle: 10 camundongos infectados e "tratados" com solução fisiológica.

Grupo II. Avaliação da sobrevida - grupo controle: 10 camundongos infectados e "tratados" com solução fisiológica.

Grupo III. Avaliação da parasitemia - grupo tratado: 10 camundongos infectados e tratados com extrato aquoso da planta.

Grupo IV. Avaliação da sobrevida - grupo tratado: 10 camundongos infectados e tratados com extrato aquoso da planta.

Grupo V. Avaliação da toxicidade do extrato: 10 camundongos que receberam por via intraperitoneal apenas solução fisiológica e extrato aquoso da planta por via oral.

O tratamento foi ministrado por via oral, nos dias 2, 3, 4, 5, e 6 após o inóculo infectante na dose de 1000mg de extrato por kg de peso corpóreo do camundongo.

Grupos semelhantes foram constituídos para testar atividade antimalárica em extrato etanólico.

Parâmetros de avaliação de atividade antimalárica. Utilizamos dois parâmetros para avaliar possível atividade antimalárica nos extratos da planta:

Parasitemia dos animais infectados. Foram feitos esfregaços de sangue, coletado da cauda dos animais dos grupos I e III, no 9º dia após o inóculo infectante que, após fixados em metanol e corados por Giemsa, foram observados ao microscópio óptico, objetiva de imersão. Em cada um dos esfregaços foram feitas duas contagens do número de hemácias parasitadas por 1000 examinadas.

Avaliação da sobrevida dos camundongos. Diariamente, durante 30 dias, os animais dos grupos II, IV e V foram observados para registro da sobrevida.

RESULTADOS

Os valores individuais da contagem do número de hemácias parasitadas/1000 examinadas, no 9º dia após o inóculo infectante, revelaram grande variabilidade.

Expressamos na Tabela 1, as medianas e as semi-amplitudes de variação das parasitemias, bem como o tempo de sobrevida em dias, dos vários grupos de camundongos.

Tabela 1 - Mediana e semi-amplitude de variação da parasitemia e do tempo de vida experimental de camundongos infectados por *P. berghei* (grupos I e II), infectados e tratados com extrato de *M. charantia* (grupos III e IV) e somente tratados com extrato (grupo V).

Extrato	Grupo	Parasitemia	Tempo de vida (em dias)
Aquoso	I	47,50 ± 39,00	-
	II	-	15,50 ± 7,50
	III	46,50 ± 67,25	-
	IV	-	16,00 ± 7,50
	V	-	30,00 ± 0,00
Etanólico	I	90,25 ± 66,00	-
	II	-	14,50 ± 6,00
	III	77,00 ± 82,50	-
	IV	-	23,00 ± 9,50
	V	-	15,00 ± 14,00

Na Tabela 2, pode-se observar a sobrevida, por período de 5 dias dos camundongos dos diferentes grupos experimentais.

Tabela 2 - Sobrevida, por período, dos camundongos infectados por *P. berghei* (grupo II), infectados e tratados com extratos de *M. charantia* (grupo IV) e somente tratados com os extratos (grupo V).

Extrato	Grupo	Período de sobrevida (dias)					
		0 a 5	6 a 10	11 a 15	16 a 20	21 a 25	26 a 30
Aquoso	II	9	8	5	0	0	0
	IV	10	8	6	1	0	0
	V	10	10	10	10	10	10
Etanólico	II	10	9	4	0	0	0
	IV	10	10	6	5	5	5
	V	9	9	4	4	3	3

Como se pode observar na Tabela 3, não houve diferença significativa da parasitemia entre os grupos I e III, nem quando utilizamos extrato aquoso nem com o uso do etanólico.

Tabela 3 - Postos médios da parasitemia de camundongos infectados por *P. berghei* e tratados com salina ou com extrato aquoso ou etanólico de *M. charantia*, com respectivo resultado do teste estatístico de Mann-Whitney.

Extrato	Postos médios do grupo		Resultado do teste estatístico (p-value)	Conclusão
	I	III		
Aquoso	10,4	10,6	U = 49 (p>0,05)	G I = G III
Etanólico	11,1	9,9	U = 44 (p>0,05)	G I = G III

A análise estatística apresentada na Tabela 4, revela que os grupos de camundongos

infectados e tratados, seja com extrato aquoso seja com etanólico, tiveram sobrevida igual aos grupos de camundongos infectados e "tratados" apenas com solução fisiológica. Por outro lado, os animais que receberam somente extrato, tanto aquoso quanto etanólico (Grupos V), não manifestaram, no período de observação, reações adversas ou indicativas de intoxicação perceptíveis, como se pode observar pela sobrevida expressa na Tabela 2 e no teste estatístico apresentado na Tabela 4.

Tabela 4 - Postos médios da sobrevida de camundongos infectados por *P. berghei* e tratados com salina ou com extrato aquoso ou etanólico de *M. charantia*; controle dos extratos (Grupo V) e resultado do teste estatístico de Kruskal-Wallis.

Extrato	Postos médios do grupo			Resultado do teste estatístico (p-value)	Conclusão
	II	IV	V		
Aquoso	10,45	10,55	25,5	H = 19,35 (p<0,001)	G II = G IV < G V
Etanólico	13,45	17,05	16,0	H = 0,88 (p>0,05)	G II = G IV = G V

DISCUSSÃO

A atividade antimalárica da *Momordica charantia* foi avaliada ministrando, por via oral, a camundongos infectados com *Plasmodium berghei*, extrato aquoso ou etanólico, durante 5 dias consecutivos após a instalação da infecção, na dose de 1000mg de extrato por kg de peso corpóreo. A escolha do extrato aquoso baseou-se no fato que a maioria das plantas é utilizada pela população sob a forma de chás, preparados sempre em água, que extraem das mesmas, substâncias polares. Já o processamento com etanol poderia extrair substâncias pouco menos polares.

A dose de 1000mg por kg foi adotada como patamar máximo, já que esta concentração dificilmente seria atingida pela ingestão simples do chá.

Por outro lado, os testes de atividade antimalárica foram realizados apenas *in vivo*, visto que geralmente substâncias introduzidas no organismo são metabolizadas ou acopladas a outras existentes no mesmo, podendo com isso modificar sua atividade. Tal fato, explicaria porque algumas substâncias que mostram atividade *in vitro*, não as apresentam quando submetidas *in vivo* e vice-versa²⁰.

A via oral foi escolhida visto sua praticidade e sua ampla utilização pela população, evitando a necessidade de maior assistência por pessoal especializado.

O intuito do presente trabalho foi verificar o possível efeito terapêutico e não profilático dos extratos. Desta forma, os extratos foram ministrados aos animais, do 2º ao 6º dia de infecção, a fim de que pudessemos avaliar possível efeito terapêutico sobre a infecção já instalada, ou seja, sobre hemácias infectadas e sobre merozoítas por elas liberados, consequentes da esquizogonia eritrocítica.

A atividade antimalárica dos extratos de *M. charantia* foi avaliada em função da parasitemia e da sobrevivência dos animais inoculados com o *P. berghei*.

A ausência de atividade antimalárica por nós encontrada corrobora os resultados de outros pesquisadores^{3,9,18,23,24}, que se utilizaram de metodologia as mais variadas. Por outro lado, os resultados encontrados por Misra e cols²⁰ que obtiveram 88% de inibição de parasitemia em *Mastomys natalensis*, tratados com extratos etanólicos de *M. dióica*, indicam atividade antimalárica em planta da família Cucurbitaceae.

Acreditando ainda na existência de atividade antimalárica em *M. charantia*, que a leva a ser indicada pela população, no tratamento de infecções por plasmódios humanos, torna-se interessante avaliar tal atividade frente aos *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. malariae* e para tanto preconizamos a metodologia descrita por Sala-Neto e cols²⁹.

SUMMARY

According to the World Health Organization malaria is one of the major public health problems in Brazil and all over developing countries, where 80% of the population use traditional medicine to solve their primary medical problems. Both treatment and control of this parasitosis have become difficult, because of parasite strains that are resistant to conventional drugs, such as chloroquine. That makes the search for new antimalarial drugs not only important but urgent. We aimed therefore at evaluating the effects of *Momordica charantia* L. (Cucurbitaceae) in mice infected with *Plasmodium berghei*. We used aqueous and ethanolic extracts in a dose of 1000mg/kg of body weight, orally, for five consecutive days (i.e. from day 2 to day 6 postinfection). We then followed up the parasitaemia during the course of infection. Although the population use this plant as an antimalarial, in our experimental conditions, *M. charantia* extracts have not shown such activity.

Key-words: Antimalarial activity. *Momordica*. *Plasmodium berghei*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abatan MO, Makind MJ. Screening *Azadirachta indica* e *Pisum sativum* for possible antimalarial activities. *Journal of Ethnopharmacology* 17:85-94, 1974.
2. Amorim CZ, Flores CA, Gomes BE, Marques AD, Cordeiro RSB. Screening for antimalarial activity in the Genus *Potomorphe*. *Journal of Ethnopharmacology* 24:101-6, 1988.
3. Amorim CZ, Marques AD, Cordeiro RSB. Screening for antimalarial activity in the plants of the Cucurbitaceae family. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 86(Suppl II):177-80, 1991.
4. Basco LK, Le Bras J. *In vitro* activity of artemisinin derivatives against African isolates and clones of *Plasmodium falciparum*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 49:301-7, 1993.
5. Bjorkman A, Phillips-Howard PA. Adverse reactions to sulfa drugs: implications for malaria chemotherapy. *Bulletin of World Health Organization* 69:297-304, 1991.
6. Braz LMA, Amato Neto V, Campos R, Baillot AA, Foster R, Nascimento SAB. Estudo sobre a possível atividade terapêutica da deferoxamina na infecção experimental de camundongos pelo *Plasmodium berghei*. *Revista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo* 45:253-5, 1990.
7. Carvalho LH, Brandão MGL, Santos-Filho D, Lopes JLC, 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. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 24:1113-1123, 1991.
8. Carvalho LH, Krettli AU. Antimalarial chemotherapy with natural products and chemically defined molecules. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 86:181-4, 1991.
9. Carvalho LH, Rocha EMM, Raslan DS, Oliveira AB, Krettli AU. *In vitro* activity of natural and synthetic naphthoquinones against erythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 21:485-7, 1988.
10. Ferraroni JJ, Speer CA, Hayes J, Suzuki M. Prevalence of chloroquine-resistant *falciparum*

- malaria in the Brazilian Amazon. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 30:526-30, 1981.
11. Fontes CCJ, Bathurst I, Krettli AU. *Plasmodium vivax* anti sporozoite antibodies in individual exposed to a single malaria outbreak in a non endemic area. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 44:28-33, 1981.
 12. Freese JA, Rossouw EJ, Gouws SE, Sharp BL. *In vitro* sensitivity of southern African isolates of *Plasmodium falciparum* to halofantine. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 87:235-239, 1993.
 13. Garavelli PL, Corti E. Chloroquine resistance in *Plasmodium vivax*. The first case in Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 86:128, 1992.
 14. Gingras BA, Jensen JB. Antimalarial activity of azithromycin and erythromycin against *Plasmodium berghei*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 49:101-105, 1993.
 15. Janse CJ, Waters AP, Kos J, Lugt CB. Comparison of *in vivo* and *in vitro* antimalarial activity of artemisin, dihydroartemisinin and sodium artesunate in the *Plasmodium berghei* - Rodent model. *International Journal of Parasitology* 24:589-594, 1994.
 16. Jiang JB, Li CQ, Guo XB, Kong YC, Arnould K. Antimalarial activity of mefloquine and ginghamosu. Apud: Chawira AN, Warhurst DC, Robison BL and Peters, 1987 - The effects of combinations of ginghamosu (Arthemisin) with standard antimalarial drugs in the suppressive treatment of malaria in mice. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 81: 554-558, 1982.
 17. Kingman S. Malaria runs riot on Brazil's wild frontier - the rapid loss of the rainforest is not the only problem facing the Amazon basin. Brazil is also suffering from a massive epidemic of malaria. *New Science* 123:24-33, 1989.
 18. Lins-Brandão M G, Botelho MG, Krettli U. 1985 - Quimioterapia experimental antimalárica com produtos naturais. I- Uma abordagem mais racional? *Ciências e Cultura* (São Paulo) 37:1152-63, 1985.
 19. Marques AC. Human migration and spread of malaria in Brazil. *Parasitology Today* 3:166-170, 1987.
 20. Misra P, Pal NL, Guru PY, Katiyar JC, Tandon JS. Antimalarial activity of Traditional Plants against Erythrocytic stages of *Plasmodium berghei*. *International Journal of Pharmacognosy* 29:19-23, 1991.
 21. Myint PT, Shwe T. Controlled clinical trial of artemether (ginghaosu derivate) versus quinine in complicated and severe falciparum malaria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 81:559-61, 1987.
 22. Myint PT, Shwe T, Soe L, Htut Y, Myint W. Clinical study of the treatment of cerebral malaria with artemether (ginghaosu derivate). *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 83:72, 1989.
 23. Neves EB, Padovani CR, Salata E. Uso de fedegoso e melão de São Caetano como antimaláricos. *In: Anais da IX Jornada Paulista de Parasitologia*, 12 e 13/06/92 - Ribeirão Preto-SP, pg. 29. 1992.
 24. Ornelas HM, Di Stasi LC, Curi PR, Salata E. Efeito de plantas medicinais sobre a infecção pelo *Plasmodium berghei* em camundongos. *Revista de Ciências Farmacêuticas*, São Paulo 12:71-80, 1990.
 25. Phillipson JD, O'Neill MJ. Antimalarial and amoebicidal natural products. *In: Hostettmann K, Lea PJ. Biologically active natural products*. Clarendon Press, Oxford, cap.4, p.49-64, 1987.
 26. Phillipson JD, O'Neill MJ. New leads to the treatment of protozoal infections based on natural product molecules. *Acta Pharmaceutica Nordica* 1: 131-43, 1989.
 27. Rang HP, Dale MM. Drogas antiprotozoários. *In: Farmacologia*, 2ª edição, Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, cap. 37, p.520-30, 1993.
 28. Sala-Neto E, Nascimento NP, Urdaneta M, Tosta CE. Multirresistência do *Plasmodium falciparum* às drogas antimaláricas: ocorrência e relação com marcadores bioquímicos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 25(supl. II):53-4, 1992.
 29. Sala-Neto E, Silva JS, Pires RO, Nascimento NP, Brenner C, Borebli JP, Tosta CE. Uma nova metodologia para a avaliação da atividade antimalárica de produtos vegetais: aplicação ao estudo de 83 espécimes da flora brasileira. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 25(supl. II):92, 1992.
 30. Santos MAV, Couto AA, Oliveira SG, Rosario VE. Estudos *in vitro* dos níveis de resistência do *Plasmodium falciparum* a drogas, de 1983 a 1986. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 29:346-53, 1987.