

## ENSAIOS ANTIMALÁRICOS *IN VIVO* DO ÓLEO ESSENCIAL DA *UNXIA CAMPHORATA* L. F. EM MODELO MURINO

### IN VIVO ANTIMALARIAL ASSAYS OF THE ESSENTIAL OIL OF *UNXIA CAMPHORATA* L. F. IN MURINE MODEL

Suelen Ramos de Oliveira<sup>1</sup>, Adriano Bentes Tenório<sup>1</sup>, John Schneider<sup>1</sup>, Bruna Cristine Martins de Sousa<sup>2</sup>,  
Christian Diniz Lima e Silva<sup>3</sup>, Juarez de Souza<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Acadêmicos dos Curso de Farmácia do Instituto Esperança de Ensino Superior, Santarém, Pará, Brasil.

<sup>2</sup>Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento de Produtos Naturais Bioativos, Universidade Federal do Oeste do Pará.

<sup>3</sup>Mestre em Biociências, Docente do Instituto Esperança de Ensino Superior, Santarém, Pará, Brasil.

<sup>4</sup>Doutor em Doenças Tropicais, Docente do Instituto Esperança de Ensino Superior, Santarém, Pará, Brasil.

Autora correspondente: e-mail: [suelenoliveira27@yahoo.com.br](mailto:suelenoliveira27@yahoo.com.br)

#### RESUMO

Apesar de evitável e tratável, a malária continua a ter um impacto devastador na saúde e na subsistência das pessoas no mundo todo. De acordo com os últimos dados disponíveis em 2017, foram estimados aproximadamente 219 milhões de casos no mundo, as mortes foram de 435.000 principalmente em crianças menores de cinco anos e grávidas. O estudo visa buscar novas formas de combater o curso da malária através da utilização da *Unxia camphorata*, espécie que tem seu efeito antimalárico pouco explorado. Foi realizada a identificação da planta e extração do óleo essencial para caracterização química e realização dos ensaios de toxicidade e antimaláricos. Utilizou-se camundongos da linhagem *BALB/c*, infectados com aproximadamente 10<sup>6</sup> eritrócitos parasitados pelo *Plasmodium berghei*, e a análise foi realizada no decorrer do tratamento durante 7 dias. Grupos experimentais: G1: controle; G2: malária; G3: cloroquina 50mg/Kg e G4, G5 e G6 com o óleo essencial de *U. camphorata*, nas doses de 50, 100 e 250 mg/Kg, respectivamente. Os parâmetros hematológicos e bioquímicos foram analisados ao final do tratamento. A concentração de 250 mg/Kg demonstrou ser eficaz na redução da parasitemia. A avaliação da função renal e hepática dos animais não demonstrou promover complicações graves neste estudo. O tempo de sobrevivência dos animais sofreu um aumento apresentado no estudo. O óleo essencial de *U. camphorata* apresentou resultados positivos sobre a redução da infecção de camundongos *BALB/c* pelo *Plasmodium berghei*.

**Palavras-chave:** Malária, *Plasmodium berghei*, *Unxia camphorata*.

#### ABSTRACT

Despite being preventable and treatable, malaria continues to have a devastating impact on the health and livelihood of people worldwide. According to the latest data available in 2017, approximately 219 million cases were estimated worldwide, deaths were 435,000 mainly in children under the age of five and pregnant. The study aims to seek new ways to combat the course of malaria through the use of *Unxia camphorata*, a species that has little explored antimalarial effect. Plant identification and essential oil extraction were carried out for chemical characterization and toxicity and antimalarial tests. *BALB / c* mice, infected with approximately 10<sup>6</sup> erythrocytes parasitized by *Plasmodium berghei*, were used, and the analysis was carried out during the treatment for 7 days. Experimental groups: G1: control; G2: malaria; G3: chloroquine 50mg / Kg and G4, G5 and G6 with the essential oil of *U. camphorata*, in doses of 50, 100 and 250 mg / Kg, respectively. Hematological and biochemical parameters were analyzed at the end of the treatment. The concentration of 250 mg / kg has been shown to be effective in reducing parasitemia. The evaluation of the renal and hepatic function of the animals was not shown to promote serious complications in this study. The survival time of the animals increased in the study. The essential oil of *U. camphorata* showed positive results in reducing the infection of *BALB / c* mice by *Plasmodium berghei*.

**Keywords:** Malaria, *Plasmodium berghei*, *Unxia camphorata*.

## 1. INTRODUÇÃO

Apesar da existência de métodos preventivos e tratamento, a malária continua a ter um impacto devastador na saúde e na subsistência de forma mundial. De acordo com os últimos dados disponíveis em 2017, foram estimados aproximadamente 219 milhões de casos no mundo, as mortes foram de 435.000 principalmente em crianças menores de cinco anos e grávidas. O Brasil notificou em 2016, 129.246 novos casos de malária e 35 óbitos. Na região amazônica houve aproximadamente 28.747 casos de malária, 1.568 internações e 20 óbitos. Destes, 113.307 foram malária por *Plasmodium vivax* e 14.357 por *Plasmodium falciparum* [1,2,3,4].

A malária é causada por um parasita intracelular obrigatório do gênero *Plasmodium* que pode desencadear um quadro clínico de evolução rápida, associada a uma série de lesões nos órgãos do hospedeiro. Os principais agentes causadores da infecção no Brasil são as espécies de *P. falciparum* e de *P. vivax*, ambas podem desencadear as formas mais severas da doença, e o agente potencialmente mais agressivo é da espécie de *P. falciparum* [5,6].

Com a progressão das manifestações clínicas, o paciente pode desenvolver quadro de infecção desde as formas mais leves até as mais graves da doença. Estas manifestações são relacionadas à fatores como: a espécie do parasita causadora da infecção; a quantidade de parasitas circulantes; o tempo da doença e o perfil da resposta imunológica do hospedeiro. [6,7]

Dentre os principais sintomas da malária, destaca-se a náusea, febre, dor de cabeça, e em alguns casos, diarreia e vômito. E em seu estágio mais grave inclui manifestações clínicas severas como a malária cerebral, hiperparasitemia, anemia normocítica grave, hipoglicemia, insuficiência renal, edema pulmonar, convulsões generalizadas repetidas, envolvimento hepático, acidose e a hemoglobinúria. Embora a malária seja uma patologia que possui terapêutica efetiva contra o seu agente causador, a ausência de diagnóstico precoce correlacionada com a falta de implementação de terapêutica adequada, podem ser fatores imprescindíveis na evolução da forma mais grave da doença. [8,9].

A principal via de transmissão da malária ocorre pela picada do mosquito fêmea *Anopheles*, e o combate ao vetor, vinculado às condições básicas de saúde e saneamento, formam um conjunto de fatores essenciais para o combate à doença. Além disso, a resistência aos antimaláricos, também se tornou um problema em todas as áreas endêmicas [3,10]. O desenvolvimento de resistência aos antimaláricos ao longo dos anos, foi mediada principalmente pela espécie de *P. falciparum*, dificultando a terapêutica com as classes de

drogas disponíveis no mercado. Este fator traz a necessidade de se buscar novas alternativas terapêuticas no combate à esta infecção, bem como buscar alternativas frequentes e contínuas para o controle da malária ao redor do mundo [11,12,13,14].

A busca por novos alvos farmacológicos no combate à malária proporcionou o interesse em estudar a planta *Unxia camphorata*, nomeada popularmente pelas denominações de são-joão-caá, é uma planta herbácea, aromática e invasora que vegeta espontaneamente nos campos estéreis e arenosos do norte do Brasil e das Guianas, estendendo-se até o Panamá. Conhecimentos populares sobre a planta são caracterizados pelo uso de chá de suas partes aéreas, funcionando como um poderoso colagogo, usado principalmente nos distúrbios digestivos, da vesícula e do fígado. [15]

O gênero *Unxia* (Asteraceae) possui amplo uso na medicina popular para o tratamento de malária, dores de estômago e gripe. Estudos com a espécie de *Unxia camphorata* L.f., apresentou resultados positivos em ensaios antimaláricos *in vitro*, baseado em ensaios de inibição da degradação de hemina pela glutatona através do isolamentos de compostos presentes na planta, sendo necessário avaliar a real atividade e atestar os resultados *in vivo* [16].

Neste sentido, a pesquisa teve por objetivo avaliar a possível atividade antimalárica do óleo essencial da *Unxia camphorata* sobre as alterações fisiopatológicas renais, hepáticas e hematológicas na malária induzida pelo *Plasmodium berghei*, bem como determinar a dose tóxica e a composição química da planta, além de quantificar os níveis de parasitemia dos animais nos diversos grupos experimentais.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 COLETA E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DA *UNXIA CAMPHORATA*

Amostras da planta *Unxia camphorata* foram coletadas em agosto de 2018, período do verão amazônico em que a temperatura varia com mínimas de 24°C e máximas de 35°C, na comunidade do Laranjal, Latitude 2°32'38'' S., Longitude 4°55'39'' W. Elev.: 44m, próximo a vila de Alter do Chão, localizada em Santarém, região Oeste do Pará, Brasil. Uma das amostras do material botânico da *U. camphorata* foi depositada no herbário HSTM – Universidade Federal do Oeste do Pará (Ufopa), sob número de registro: 9321.

Foram utilizadas todas as partes do material vegetal para extração do óleo essencial da *U.*

*camphorata*, que após ser coletado, foi lavado em água corrente, seco em estufa a 35 °C por 72 h, triturado em moinho de facas, resultando em aproximadamente 537,7 g de material e extraído em aparelho de Clevenger, por hidrodestilação durante 4 h, obtendo-se assim 3,41 g, sendo o óleo acondicionado em pequeno frasco de vidro âmbar e mantido sob refrigeração. O cálculo do rendimento foi realizado através da relação entre a massa do óleo obtido e a massa de material vegetal utilizado na extração [17].

O óleo essencial foi analisado quimicamente no aparelho GCMS-QP 2010 Ultra, marca Shimadzu equipado com coluna capilar de sílica fundida Rxi-5ms de 30m x 0,25 mm (diâmetro) x 0,25 µm (espessura do filme), revestida com 5% de difenildimetilpolisiloxano. As condições de análise foram: temperatura do injetor de 250°C; programação de temperatura do forno de 60-240°C (3°C/min); hélio (99.995%) como gás de arraste; injeção no modo Split de 1 µL da amostra; razão Split 1:20; ionização por impacto eletrônico (EI) 70 eV; temperatura da fonte de ionização e da linha de transferência de 200 e 250 °C, respectivamente. Os espectros de massa foram obtidos por varredura automática, a 0,3 scans/s, com fragmentos de massas na faixa de 35-400 unidades de massa atômica, complementados por comparação computadorizada da biblioteca do aparelho, e literatura [18].

## 2.2 ENSAIOS ANTIMALÁRICOS

### 2.2.1 Animais

Foram utilizados camundongos *BALB/c* fêmeas, com oito semanas de vida, provenientes do Biotério do Laboratório de Farmacologia do Instituto Esperança de Ensino Superior (Iespes) desde o nascimento. Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno com maravalha autoclavada e tampa de aço com três animais em cada uma em condições de temperatura de aproximadamente 22±2°C sobre um ciclo claro-escuro de 12 horas, com ração balanceada para roedores (Labina®) e água *ad libitum*.

### 2.2.2 Ensaio da toxicidade aguda

O ensaio de toxicidade aguda foi realizado seguindo as diretrizes da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) - 423/2001 [19]. Foram divididos 30 animais em duas etapas. Em cada etapa foram selecionados 3 camundongos por dose fixa. O

nível de dose para ser usada como a dose de partida foi selecionado a partir da dose inicial de níveis fixos, 5, 50, 300 e 2000 mg/Kg de peso corporal.

### 2.2.3 Testes antimaláricos

Para os testes foram divididos seis grupos contendo aleatoriamente 12 animais em cada: **Grupo Controle (G1)**: animais que não foram inoculados com o *Plasmodium berghei* e submetidos ao estímulo de tratamento com solução veículo (Solução fisiológica 0,9% + Tween 80); **Grupo Malária (G2)**: os animais que foram infectados pelo *Plasmodium berghei* e submetidos ao estímulo de tratamento com solução veículo (SF 0,9% + Tween 80); **Grupo Cloroquina (G3)**: os animais que foram infectados pelo *Plasmodium berghei* e submetidos ao tratamento com (Cloroquina) na dosagem de 50mg/Kg; e **Grupos *Unxia camphorata* (G4), (G5) e (G6)**: os animais que foram infectados com *Plasmodium berghei* e submetidos ao tratamento com óleo essencial diluído na concentração de 50, 100 e 250 mg/Kg, respectivamente.

O início do tratamento começou a ser realizado no quinto (5) dia, após a inoculação de  $10^6$  eritrócitos parasitados com *Plasmodium berghei* nos animais, depois de ser confirmada a densidade parasitária. O tratamento foi realizado durante sete (7) dias consecutivos por via oral, uma vez ao dia. Após o último dia de tratamento os animais foram mantidos em jejum para a realização dos exames.

### 2.2.4 Análises da densidade parasitária e supressão da parasitemia.

Os parasitas foram analisados a partir de amostras coletadas da cauda dos animais, o método de coloração utilizado foi o panótico rápido da Laborclin, onde se baseia no princípio de coloração hematológica estabelecida por Romanowsky, atuando em 15 segundos. A porcentagem de parasitemia foi determinada em cada animal como a razão entre a quantidade de eritrócitos parasitados e a quantidade total de células (500 células por esfregaço), avaliada no avaliada no 4º, 7º, 9º e 11º dias após a inoculação dos animais, conforme a fórmula que segue:

$$\% \text{ parasitemia} = \text{quantidade de eritrócitos parasitados} / 500$$

### 2.2.5 Análise de sobrevida

Em cada grupo experimental foram escolhidos aleatoriamente dois animais para análise de sobrevivência após a inoculação do plasmódio e tratamento com a *U. camphorata*. Os animais foram mantidos a uma temperatura controlada de  $22\pm 2$  °C, sobre um ciclo claro-escuro de 12 horas, com ração balanceada (Labina® - ração para animais de laboratório) e água *ad libitum*, até o óbito de forma natural.

#### 2.2.6 Parâmetros bioquímicos e hematológicos

Os exames bioquímicos foram realizados no Laboratório Santos de Análises Clínicas localizado em Santarém Pará, através do Analisador Bioquímico Automático BS-200 Mindray, utilizando kits da marca Vida Biotecnologia. Ao final do tratamento, foram realizados os exames de Glicose, Aspartato aminotransferase (AST), Alanina aminotransferase (ALT), Ureia e Creatinina.

Os exames hematológicos foram realizados no Laboratório-Escola de Análises Clínicas do Instituto Esperança de Ensino Superior – LabIESPES, sendo analisados no Analisador Hematológico Plus 2900 Veterinário. Ao final do tratamento, foi realizada a contagem completa das células sanguíneas: glóbulos vermelhos, hemoglobina, hematócrito e contagem de plaquetas; números absolutos de leucócitos, linfócitos, monócitos e neutrófilos segmentados.

#### 2.2.7 Aspectos éticos

Os experimentos foram conduzidos respeitando os usos e cuidados com os animais conforme preconizados pela Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA do IESPES, sob o parecer consubstanciado de protocolo número 003/18 aprovado em setembro de 2018.

#### 2.2.8 Análise estatística.

Os dados foram analisados estatisticamente com o auxílio do software *Graph Pad, San Diego, CA Prism 5.0®*. Os resultados foram analisados por ANOVA, seguido do teste de Tukey, com o nível de significância estabelecido em ( $p < 0,05$ ).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Caracterização química do óleo essencial da *Unxia camphorata*

O rendimento do óleo essencial obtido pela extração foi de 0,63% e através dos dados espectrométricos foram detectados 150 compostos, sendo o percentual da composição química de 99,36% e, desta, aproximadamente 87% foram classificados como majoritários com concentração a partir de 0,50%, divididos entre monoterpenos e sesquiterpenos a partir do peso molecular. Dentre os constituintes majoritários, destaca-se o monoterpeno cânfora com 7,85%, e os sesquiterpenos: junenol (9,95%), (E)-cariofileno (9,50%),  $\alpha$ -humuleno (1,61%) e  $\gamma$ -eudesmane (0,84%).

### 3.2 Avaliação da toxicidade aguda

A administração da concentração máxima de óleo essencial da *Unxia camphorata* (2000 mg/Kg), não promoveu alterações como perda de pêlo ou cor, tremores, aumento da salivação, diarreia, letargia, aumento ou diminuição do sono, dor ou sofrimento ou perda de peso, não havendo óbito nos grupos experimentais em estudo. Demonstrando assim uma baixa toxicidade na amostra analisada.

### 3.3 Análise quantitativa da evolução da parasitemia e dos níveis de concentração de glicose plasmática

A contagem de hemácias infectadas das amostras dos grupos experimentais contaminados pelo *Plasmodium berghei*, demonstrou que houve uma redução significativa no percentual de parasitas entre G2 ( $42,73 \pm 8,85$  %) quando comparados com G3 ( $5,20 \pm 4,03$  %) e G6 ( $19,58 \pm 2,17$  %) ( $p < 0,001$ ) (Figura 1). A supressão parasitária no G6 foi de 54,18% e no G3 de 87,81%. Não foi significativa a supressão do G4 e G5 quando comparadas ao G2.

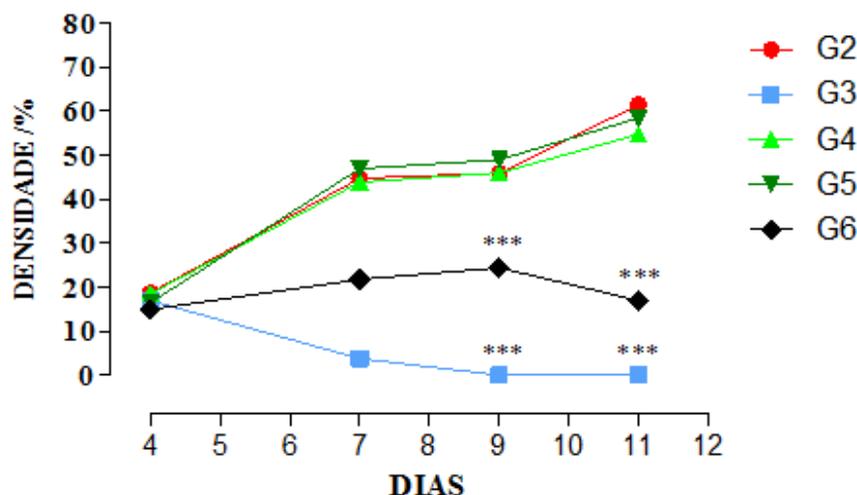
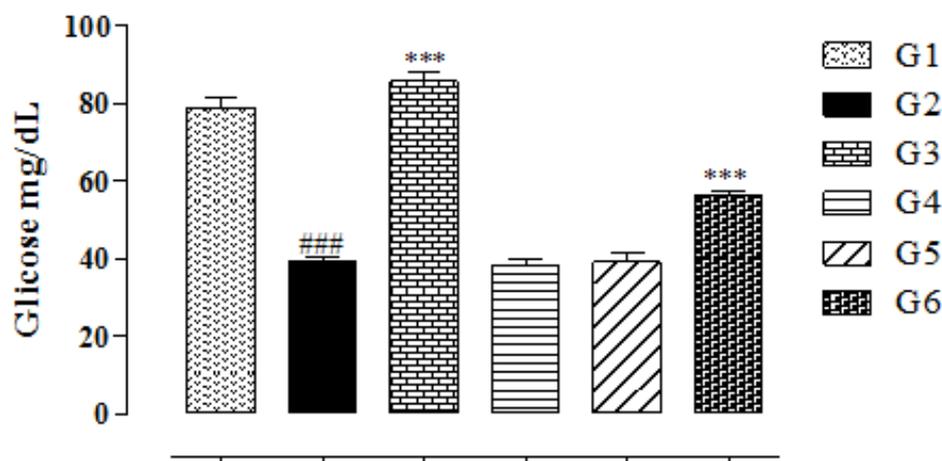


Figura 1. Evolução da parasitemia dos animais dos grupos experimentais.

Cada ponto representa a média  $\pm$  e.p.m. da densidade parasitária dos animais dos grupos G2 (malária), G3 (cloroquina 50 mg/kg/dia), G4 até G6 (*U. camphorata* 50, 100 e 250 mg/Kg/dia, respectivamente). N= 10 animais por grupo. \*\*\*Representa uma diferença significativa ( $p < 0.001$ ) na densidade parasitária dos animais dos grupos G3 e G6 comparados ao G2.

A ação da diminuição da carga parasitária no G6 – *Unxia camphorata* 250 mg/Kg, pode estar relacionada à *eudesmanes sesquiterpeno* encontrados na amostra do óleo essencial. Em ensaios que [16] analisaram os tipos de *eudesmanes sesquiterpenos* isolados da *U. camphorata*, observou-se uma fraca atividade de degradação da hemina *in vitro* associado ao resultado de  $DL_{50}$  (toxicidade aguda) insignificante. É provável que o ensaio de degradação da hemina não se correlacione diretamente com a atividade antimalárica presumida. Porém, serão necessários mais trabalhos para isolar o composto ou os compostos que deram origem à essa atividade.

A avaliação de glicemia demonstrou que houve diferença significativa do G2 ( $39,00 \pm 1,30$  mg/dL) quando comparado ao G1 ( $78,80 \pm 3,02$  mg/dL), sendo observado uma redução nos níveis de glicose plasmática. Foi realizada a comparação entre o G2 *versus* os grupos tratados com G3 ( $85,75 \pm 2,13$  mg/dL) e G6 ( $56,25 \pm 1,31$  mg/dL) e observou-se uma diferença significativa, com aumento nos níveis glicêmicos no tratamento de *Unxia camphorata* na dose de 250mg/Kg (Figura 2).



**Figura 2.** Níveis de glicemia.

Cada barra representa a média  $\pm$  e.p.m. da glicose plasmática dos animais do grupos G1 (controle), G2 (malária), G3 (cloroquina 50 mg/kg/dia), G4 até G6 (*U. camphorata* 50, 100 e 250 mg/Kg/dia, respectivamente). N= 10 animais por grupo. ### Representa uma diferença significativa ( $p < 0.001$ ) na glicemia dos animais dos grupos G2 em relação ao G1. \*\*\* Representa uma diferença significativa ( $p < 0.001$ ) da glicemia dos animais do grupo G3 e G6 comparados ao G2.

Durante uma infecção grave por malária e devido ao alto consumo metabólico, gerado pelo stress da infecção, associado ao uso pelo parasita, é comum que os níveis de glicose no sangue fiquem baixos ocasionando hipoglicemia. Outros fatores como disfunção hepática e renal dificultam o processo de gliconeogênese, contribuindo também para a diminuição da glicose, além da própria debilidade física (prostração) que pode influenciar no hábito alimentar dos indivíduos com malária [9,20,21].

Os eritrócitos parasitados utilizam cerca de 100 vezes mais glicose quando comparados aos eritrócitos não parasitados, e durante a fase trofozoíta do parasita, o consumo de glicose tende a ser maior, pois esta é a etapa de maior atividade metabólica do *Plasmodium*, sendo que a supressão parasitária vista nos grupos estudados pode desempenhar papel importante na redução do consumo de glicose [22, 23].

### 3.4 Avaliação dos parâmetros de função hepática e renal

A atividade de AST apresentou uma diferença significativa do G2 ( $577,5 \pm 10,48$  U/L) quando comparado ao G1 ( $190,8 \pm 8,12$  U/L). Essa diferença também foi vista, quando comparado o G2 com os grupos G3 ( $273,8 \pm 3,92$  U/L); G5 ( $365,3 \pm 9,17$  U/L) e G6 ( $265 \pm 14,20$

U/L), respectivamente, demonstrando uma redução nos valores de AST nestes animais. Foi evidenciado uma modificação na presença da ALT, com alterações significativas do G2 ( $482,2 \pm 11,82$  U/L) quando comparado ao G1 ( $59,17 \pm 1,99$  U/L), essa diferença também foi vista nos grupos G2 com os G3 ( $123,0 \pm 6,27$  U/L); G4 ( $381,2 \pm 10,93$  U/L), G5 ( $226,0 \pm 7,90$  U/L) e G6 ( $187,6 \pm 8,18$  U/L) (Tabela 1), quando comparado ao grupo sem tratamento.

**Tabela 1** - Parâmetros da função hepática nos animais dos grupos experimentais.

	AST (U/L)	ALT (U/L)
G1	$190,8 \pm 8,12$	$59,17 \pm 1,99$
G2	$577,5 \pm 10,48^{###}$	$482,2 \pm 11,82^{###}$
G3	$273,8 \pm 3,92^{***}$	$123,0 \pm 6,27^{***}$
G4	$566,3 \pm 12,74$	$381,2 \pm 10,93^{***}$
G5	$365,3 \pm 9,17^{***}$	$226,0 \pm 7,90^{***}$
G6	$265,0 \pm 14,20^{***}$	$187,6 \pm 8,18^{***}$

**Legenda:** AST: Aspartato aminotransferase; ALT: Alanina aminotransferase. 10 animais em cada grupo: G1 (controle), G2 (malária), G3 (cloroquina 50 mg/kg/dia), G4 até G6 (*U. camphorata* 50, 100 e 250 mg/Kg/dia, respectivamente).<sup>###</sup>Representa uma diferença significativa ( $p < 0.001$ ) dos parâmetros hepáticos dos animais do G2 comparado ao G1.<sup>\*\*\*</sup>Representa uma diferença significativa ( $p < 0.001$ ) dos parâmetros hepáticos dos animais do G3 ao G6 comparados ao G2.

O aumento das enzimas hepáticas na infecção da malária é sugestivo de comprometimento hepático. Esta observação demonstra que o estágio hepático do ciclo de vida do parasita em seu hospedeiro humano é acompanhado por perturbação significativa na membrana dos hepatócitos, acarretando ao vazamento das enzimas hepáticas para uma circulação geral [24]. O relato de aumento, principalmente das transaminases alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), podem evidenciar a necrose dos hepatócitos durante o ciclo inicial da infecção no hospedeiro humano [25,26]. As evidências do presente estudo mostram que a infecção por malária pode induzir alterações nas atividades das enzimas hepáticas. O tratamento com *Unxia camphorata* promoveu uma redução significativa

destes marcadores hepáticos, demonstrando uma eficácia na redução do dano hepático promovido pela malária.

A atividade antiparasitária pode estar vinculada ao mecanismo de ação atribuído aos óleos essenciais e compostos sesquiterpenos, os quais apresentam propriedade lipofílica [27]. Com isso, possui grande potencial para exercer uma ação biológica causando danos na estrutura do parasita e alterando suas funções, visto que o  $\alpha$ -humuleno e o (E)-cariofileno foram compostos majoritários identificados na *Unxia camphorata*. E a redução da carga parasitária e conseqüentemente a diminuição da retenção de esquizontes maduros no fígado consegue contribuir para a melhora na função hepática, o que deve estar relacionado à ação desses compostos.

A concentração de Ureia sofreu uma modificação significativa do G2 ( $119,0 \pm 3,29$  mg/dL) quando comparado ao G1 ( $62,00 \pm 2,25$  mg/dL). Esta mesma redução foi verificada nos grupos G3 ( $58,00 \pm 3,02$  mg/dL); G4 ( $91,75 \pm 2,32$  mg/dL), G5 ( $79,25 \pm 2,95$  mg/dL) e G6 ( $55,00 \pm 2,27$  mg/dL), quando comparado ao grupo G2. A análise de Creatinina não promoveu uma diferença significativa entre os grupos G2 ( $0,51 \pm 0,0063$  mg/dL) quando comparado a todos os grupos: G1 ( $0,50 \pm 0,0125$  mg/dL); G3 ( $0,53 \pm 0,0127$  mg/dL); G4 ( $0,49 \pm 0,0048$  mg/dL); G5 ( $0,50 \pm 0,0144$  mg/dL) e G6 ( $0,52 \pm 0,0156$  mg/dL) (Tabela 2).

**Tabela 2** - Parâmetros da função renal nos animais dos grupos experimentais.

	UREIA (mg/dL)	CREATININA (mg/dL)
G1	$62,00 \pm 2,25$	$0,50 \pm 0,0125$
G2	$119,0 \pm 3,29^{###}$	$0,51 \pm 0,0063$
G3	$58,00 \pm 3,02^{***}$	$0,53 \pm 0,0127$
G4	$91,75 \pm 2,32^{***}$	$0,49 \pm 0,0048$
G5	$79,25 \pm 2,95^{***}$	$0,50 \pm 0,0144$
G6	$55,00 \pm 2,27^{***}$	$0,52 \pm 0,0156$

**Legenda:** 10 animais em cada grupo: G1 (controle), G2 (malária), G3 (cloroquina 50 mg/kg/dia), G4 até G6 (*U. camphorata* 50, 100 e 250 mg/Kg/dia, respectivamente). <sup>###</sup>Representa uma diferença significativa ( $p < 0.001$ ) dos parâmetros renais dos animais do G2 comparado ao G1. <sup>\*\*\*</sup>Representa uma diferença significativa ( $p < 0.001$ ) dos

parâmetros renais dos animais do G3 ao G6 comparados ao G2.

Nas lesões renais causadas pela espécie de *P. falciparum*, as alterações tubulares são mais proeminentes do que as glomerulares, podendo variar desde um acometimento de pequena monta até necrose tubular aguda e insuficiência renal aguda (IRA), frequentemente oligúrica e hipercatabólica. O efeito das hemácias infectadas na microcirculação é o principal fator fisiopatogênico da IRA - além dos eventos hemodinâmicos, imunológicos, elevação sérica de creatinina e ureia, e as alterações metabólicas. A disfunção renal também é correlacionada à hiperparasitemia, onde as infecções secundárias e a gravidade da malária causada pelo *falciparum* podem ser as principais razões para a associação entre leucocitose e comprometimento da função renal [28,29,30,31].

Os estudos citam que o sesquiterpeno (E)-cariofileno, presente na composição química da maioria dos óleos essenciais apresentou efeito anti-inflamatório, inibidor de canais de  $Ca^{2+}$  e efeito imunomodulador. O efeito anti-inflamatório do (E)-cariofileno pode estar justificado através da inibição das citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , envolvidas na resposta imune celular durante o processo inflamatório. A partir deste estudo, a planta *U. camphorata* pode auxiliar na regulação metabólica, justificando assim, a manutenção dos níveis de Ureia e Creatinina [32,33].

### 3.5 Avaliação dos parâmetros hematológicos dos grupos experimentais

Para a contagem de eritrócitos verificou-se uma diferença significativa de G2 ( $2,09 \pm 0,42 [10^6/\mu L]$ ) quando comparado ao G1 ( $9,04 \pm 1,46 [10^6/\mu L]$ ), sendo observado uma redução na presença de eritrócitos no grupo malária não tratado. Quando o G2 foi comparado com G3 ( $8,29 \pm 1,23 [10^6/\mu L]$ ) e G6 ( $6,96 \pm 1,14 [10^6/\mu L]$ ), constatou-se que o tratamento promoveu um aumento significativo no número de hemácias. O hematócrito demonstrou que houve uma diferença significativa do G2 ( $15,72 \pm 2,81 \%$ ) quando comparados ao G1 ( $41,44 \pm 2,19 \%$ ). Houve, também uma diferença significativa dos grupos G3 ( $40,86 \pm 5,82 \%$ ) e G6 ( $31,60 \pm 6,48 \%$ ) em relação ao grupo G2. A análise da concentração de hemoglobina demonstrou que o quadro da infecção promoveu uma redução significativa na concentração de hemoglobina dos animais, sendo observada uma diferença significativa deste elemento no G2 ( $5,48 \pm 1,85g/dL$ ) quando comparado ao G1 ( $16,25 \pm 0,26g/dL$ ). Todavia, os animais dos grupos G3 ( $15,22 \pm 1,85g/dL$ ) e G6 ( $10,13 \pm 1,85g/dL$ ) apresentaram níveis elevados de hemoglobina nas hemácias

quando comparados ao G2. Com relação às plaquetas, constatou-se uma redução significativa do G2 ( $165 \pm 52,09 [10^3/\mu\text{L}]$ ) quando comparado ao G1 ( $456 \pm 94,02 [10^3/\mu\text{L}]$ ) e um aumento significativo do G3 ( $532 \pm 18,57 [10^3/\mu\text{L}]$ ) quando comparado ao G2 (Tabela 3).

**Tabela 3** - Parâmetros hematológicos nos animais dos grupos experimentais.

	N. Hemácias ( $10^6/\mu\text{L}$ )	Hematócrito (%)	Hemoglobina (g/dL)	Plaquetas ( $10^3/\mu\text{L}$ )
G1	$9,04 \pm 1,46$	$41,44 \pm 2,19$	$16,25 \pm 0,26$	$456 \pm 94,02$
G2	$2,09 \pm 0,42^{###}$	$15,72 \pm 2,81^{###}$	$5,48 \pm 1,85^{###}$	$165 \pm 52,09 \#$
G3	$8,29 \pm 1,23^{***}$	$40,86 \pm 5,82^{***}$	$15,22 \pm 1,85^{***}$	$532 \pm 18,57^{**}$
G4	$2,10 \pm 0,55$	$19,67 \pm 3,88$	$6,66 \pm 0,94$	$623 \pm 26,50$
G5	$3,68 \pm 0,69$	$21,37 \pm 3,82$	$6,60 \pm 1,31$	$405 \pm 82,00$
G6	$6,96 \pm 1,14^{***}$	$31,60 \pm 6,48^{***}$	$10,13 \pm 1,85^{***}$	$142 \pm 51,00$

**Legenda:** 10 animais em cada grupo: G1 (controle), G2 (malária), G3 (cloroquina 50 mg/kg/dia), G4 até G6 (*U. camphorata* 50, 100 e 250 mg/Kg/dia, respectivamente). <sup>###</sup>Representa uma redução significativa ( $p < 0,01$ ) dos parâmetros hematológicos da série vermelha dos animais do G2 comparado ao G1. <sup>\*\*\*</sup>Representa um aumento significativo ( $p < 0,001$ ) dos parâmetros hematológicos da série vermelha dos animais do G3 e G6 comparados ao G2.

Anormalidades hematológicas são consideradas um marco da malária, com impacto no resultado final e representando índices de valor prognóstico e de acompanhamento. Estes incluem anemia grave, distúrbios de coagulação, alterações numéricas ou funcionais de leucócitos e envolvimento do baço. O ciclo sanguíneo ocorre de forma rápida, remodelando a estrutura das células infectadas e tornando-as mais rígidas [10,34,35,36].

Estudos [37,38] mostraram que o composto (E)-cariofileno possui ação antioxidante. Ao associar a ação antioxidante promovida por este composto presente na planta, com o combate à hemólise dos eritrócitos, nota-se um resultado positivo na série vermelha do grupo G6 que pode estar ligada ao composto (E)-cariofileno.

Na contagem diferencial da série branca, foi observado uma diferença significativa de G2 quando comparado ao grupo G1, na contagem de neutrófilos segmentados. No entanto,

quando o grupo G2 é comparado com os grupos de tratamento G5 e G6, verifica-se uma não alteração significativa (Tabela 4).

**Tabela 4** - Parâmetros hematológicos nos animais dos grupos experimentais.

	Neutrófilos Segmentados	Linfócitos	Monócitos
G1	39,00±7,61	59,40±7,76	1,60±1,51
G2	75,80±3,76 <sup>###</sup>	27,40±5,81 <sup>###</sup>	2,60±1,81
G3	51,40±10,29 <sup>***</sup>	48,60±10,29 <sup>**</sup>	1,00±1,00
G4	65,40±5,94	30,00±4,58	1,80±0,83
G5	64,75±5,56	28,50±4,50	2,75±0,95
G6	69,67±8,35	24,33±8,57	4,00±0,89

**Legenda:** 10 animais em cada grupo: G1 (controle), G2 (malária), G3 (cloroquina 50 mg/kg/dia), G4 até G6 (*U. camphorata* 50, 100 e 250 mgK/g/dia, respectivamente). <sup>###</sup>Representa a diferença (p <0.001) dos parâmetros hematológicos da série branca dos animais do G2 comparado ao G1. <sup>\*\*</sup>Representa um aumento significativo (p <0.001) dos parâmetros hematológicos da série branca dos animais do G3 comparado ao G2. <sup>\*\*\*</sup>Representa uma redução significativa (p <0.001) dos parâmetros hematológicos da série branca dos animais do G3 comparado ao G2.

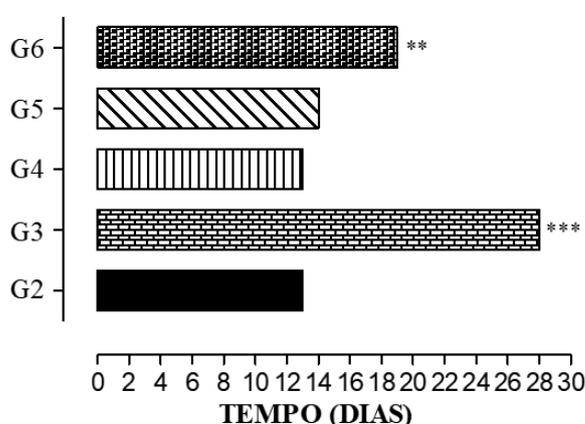
O sistema imunológico é de grande importância no combate ao parasita, pois com a elevação natural de células do sistema imune, a destruição do parasita em indivíduos infectados é auxiliada. A contagem de leucócitos é geralmente normal, embora possa estar elevada em infecções muito graves. Podemos encontrar também uma ligeira monocitose, linfopenia e eosinopenia, com linfocitose e eosinofilia reativas nas semanas seguintes à infecção aguda [39]. Estudos apontam que o mecanismo imunológico do hospedeiro envolvido na infecção pelo plasmódio, desenvolve uma resposta contra o parasita que altera todos os componentes do sistema imune [27,40].

Um estudo sobre a composição das plantas [41] afirma que o alto teor de sesquiterpenos demonstram eficácia no impedimento do extravasamento de proteínas sem alterar a contagem de neutrófilos, notando assim uma atividade anti-inflamatória com pouca ou nenhuma participação de migração de neutrófilos na circulação. No presente trabalho observamos que os resultados dos grupos estudados não demonstraram significância quando comparados aos

animais não tratados do grupo Malária, evidenciando que a administração do óleo de *U. camphorata* pode auxiliar na manutenção da resposta inflamatória do parasita no hospedeiro.

### 3.6 Avaliação da sobrevida

A análise dos animais infectados com o *Plasmodium berghei* revelou que o tratamento com a *Unxia camphorata* na concentração de 250 mg/Kg promoveu um prolongamento no tempo de sobrevivência dos animais (Figura 3).



**Figura 3.** Tempo de sobrevida dos animais. Cada barra representa o tempo de sobrevida de cada animal após a inoculação de *P. Berguei* no grupo G2 (malária), G3 (cloroquina 50 mg/kg/dia), G4 até G6 (*U. camphorata* 50, 100 e 250 mg/Kg/dia, respectivamente). N= 2 animais por grupo. ### Representa uma diferença significativa ( $p<0.01$ ) da relação do tempo de sobrevivência entre o grupo G6 e o G2. \*\*\* Representa uma diferença significativa ( $p<0.001$ ) da relação do tempo de sobrevivência entre o grupo G3 e o G2.

Ao comparar o estudo realizado [36] sobre a análise de sobrevida, o tratamento pode estar diretamente relacionado com o tempo de sobrevida dos animais com malária, assim, a possível eficácia antimalárica do óleo essencial de *U. camphorata* sugere uma relação positiva quanto ao aumento na expectativa de vida do grupo experimental.

## 4. CONCLUSÃO

O óleo essencial de *U. camphorata* demonstrou ser eficaz sobre a redução da parasitemia na infecção de camundongos BALB/c pelo *Plasmodium berghei*, além de permitir uma melhora na função hepática, renal e do nível glicêmico dos animais estudados. Quanto à avaliação hematológica, o tratamento com a *U. camphorata* promoveu uma melhora significativa nos parâmetros da série branca e vermelha do sangue. Este resultado pode estar relacionado à ação

de compostos antioxidantes da planta reduzindo o dano da infecção sobre o animal, bem como a diminuição da carga parasitária no hospedeiro. O tempo de sobrevivência dos animais tratados apresentou resultados positivos, corroborando com os resultados apresentados nas análises bioquímicas e hematológicas.

O estudo realizado se torna pioneiro para a análise da ação da *U. camphorata* sobre o quadro de malária experimental avaliado durante a pesquisa. Estes dados podem servir de base para estudos posteriores com determinações de dosagens maiores e isolamento dos compostos ativos do óleo essencial, além da possível identificação de um princípio ativo, sugerindo ser o responsável pela atividade antimalárica visualizada neste estudo.

### **APOIO FINANCEIRO**

Ao Instituto Esperança de Ensino Superior (Iespes) e a Universidade Federal do Oeste do Pará (Ufopa) que apesar de não possuir subsídio de bolsa ou recurso financeiro, apoiaram com materiais, espaços e equipamentos necessários para a realização da pesquisa.

### **CONFLITOS DE INTERESSES**

Não houve conflito de interesses na presente pesquisa.

### **REFERÊNCIAS**

[1] OPAS/OMS. Casos de malária aumentam na região das Américas. ORGANIZAÇÃO PAN AMERICANA DE SAÚDE, 2018. Disponível em: [https://www.paho.org/bra/index.php?option=com\\_content&view=article&id=5591:casos-de-malaria-aumentam-na-regiao-das-americas&Itemid=812](https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5591:casos-de-malaria-aumentam-na-regiao-das-americas&Itemid=812). Acesso em: 20 de agosto de 2018.

[2] BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Situação epidemiológica da malária no Brasil, 2012 e 2013. Boletim Epidemiológico: Ministério da Saúde, vol.46, n.43, 2015.

[3] BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Descrição do processo de monitoramento dos testes de diagnóstico rápido de malária, Brasil, 2014 a 2016. Boletim Epidemiológico, Ministério da Saúde, BE vol.50, n.12, 2019.

[4] WORLD MALARIA REPORT 2018. Geneva: World Health Organization; 2018. Disponível em: <https://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2018/report/en/> Acesso em: 20 de agosto de 2018.

- [5] ANTUNES, M.L. Malária grave: Marcadores clínicos e imunológicos de gravidade e prognóstico. Tese (Doutorado em Medicina Tropical). Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2016.
- [6] FREITAS, L.A. Principais complicações causadas pela malária. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina), Faculdade Anhanguera, São Paulo, 2018.
- [7] LADEIRA, G.M.; MANZOTTI, L.R.; FONTES, C.J.F. Dano muscular associado à malária causada pelo *Plasmodium vivax*. Revista eletrônica FACIMEDIT, v.5, n.2, p.20-33, 2016.
- [8] SOUZA, B.T.T. Contribuição dos modelos murinos na malária experimental. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Centro Universitário de Brasília, Brasília, 2017.
- [9] LACERDA, M.V.G. Manifestações clínicas e patogênese da plaquetopenia na malária. Tese (Doutorado em Medicina Tropical) - Universidade de Brasília, Brasília, 2007.
- [10] DALMIRO, P. Efficacy of intravenous injection of quinine for treating severe malaria. Boletín de Malariología y Salud Ambiental, v.59, n.2, 2019.
- [11] VENANZI, E.; LÓPEZ-VÉLEZ, R. Resistencia a los antimaláricos. Rev Esp Quimioter, v.2; n.29, p.72-75, 2016.
- [12] CRAVO, P.; ROSÁRIO, V.E. Aspectos de genética molecular da resistência aos fármacos antimaláricos. Boletim de Biotecnologia. Bio-medicina e Saúde Pública, 2002.
- [13] APARICIO, R.C. Resistencia al tratamiento combinado con artemisina (tca) en *Plasmodium falciparum*. Trabajo Fin de Grado (Facultad de Farmacia). Universidad Complutense, 2018.
- [14] GOMES, L.R. Rastreamento de mutações em gene marcador da quimiorresistência do *Plasmodium falciparum* à artemisinina e em genes potencialmente associados a resistência do *P. vivax* à cloroquina em isolados plasmodiais brasileiros. Tese (Doutorado em Biologia Parasitária) - Fundação Oswaldo Cruz, 2018.
- [15] BUSMAN, D.V.; ZOGHBI, M.G.; POTIGUARA, R.C.; ANDRADE, E.H. Volatiles from different organs of *Unxia camphorata* L. f. growing wild in the Amazon. Biochemical systematics and ecology, v.33, n.12, p.1269-1273, 2005.
- [16] CHATURVEDULA, V.S.; FAROOQ, A.; SCHILLING, J.K.; MALONE, S. DERVELD, I; WERKHOVEN, M.C.; WISSE, J.H.; RATSIMBASON, M.; KINGSTON, D.G. New Eudesmane Derivatives from *Melampodium camphoratum* from the Suriname Rainforest. Journal of natural products, v.67, n.12, p.2053-2057, 2004.
- [17] DUARTE, M.C.; FIGUEIRA, G.M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V.L.; DELARMELINA, C. Anti-candida activity of Brazilian medicinal plants. Journal of ethnopharmacology, v.97, n.2, p.305-311, 2005
- [18] ADAMS, R.P.; SPARKMAN, O.D. Review of Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. Journal American Society Mass Spectrometry,

v.18, p.803-806, 2007.

[19] ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT, (OECD). Guidelines for the testing of chemicals, OECD 423. Acute Oral Toxicity. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, 2001.

[20] DEHARO, E.; COQUELIN, F.; CHABAUD, A.G.; LANDAU, I. The erythrocytic schizogony of two synchronized strains of *Plasmodium berghei*, NK65 and ANKA, in normocytes and reticulocytes. Parasitology research, v.82, n.2, p.178-182, 1996.

[21] LANDAU, I.; BOULARD, Y. Life cycles and morphology. In: KILLICK-KENDRICK, R.; PETERS, W. Rodent malária, Academic Press, p.53-84, 1978.

[22] MEHTA, M.; SONAWAT, H.M.; SHARMA, S. Glycolysis in *Plasmodium falciparum* results in modulation of host enzyme activities. Journal of vector borne diseases, v.43, n.3, p.95-103, 2006.

[23] KIRK, K. Ion channels in the 'malaria-infected' infected red blood cell. Physiol News, n.51, p.17-19, 2003.

[24] ONYESOM, I.; ONYEMAKONOR, N. Levels of parasitaemia and changes in some liver enzymes among malarial infected patients in Edo-Delta Region of Nigeria. Curr Res J BiolSci, v.3, n.2, p.78-81, 2011.

[25] KOCHAR, D.K.; SINGH, P.; AGARWAL, P.; KOCHAR, S.K.; POKHARNA, R.; SAREEN, P.K. Malarial hepatitis. Journal association of physicians of India, v.51, p.1069-1076, 2003.

[26] COSTA, A.G.; TARRAGÔ, A.M.; GARCIA, N.P. PIMENTEL, J.P., NEVES, W.L., DOS SANTOS MELO, G.Z., HECKMANN, M.I., MALHEIRO, A. Influência da infecção por *Plasmodium vivax* nos marcadores hematológicos e hepáticos em pacientes de um município da Região Amazônica brasileira. Revista Pan-Amazônica de Saúde, v.8, n.2, p.11-19, 2017.

[27] OLIVEIRA, R.N. Atividade do óleo essencial, frações e sesquiterpenos de *Baccharistriera* (Less) sobre *Schistosoma mansoni*. Tese (Doutorado em Biologia Animal), Universidade Estadual de Campinas, 2016.

[28] GOMES, A.P.; VITORINO, R.R.; COSTA, A.D.P.; MENDONÇA, E.G.D.; OLIVEIRA, M.G.D.A.; SIQUEIRA-BATISTA, R. Malária grave por *Plasmodium falciparum*. Revista Brasileira de Terapia Intensiva, v.23, n.3, p.358-369, 2011.

[29] BARSOUM, R.S. Malarial acute renal failure. Journal of the American Society of Nephrology, v.11, n.11, p.2147-2154, 2000.

[30] MIRANDA-ARBOLEDA, A.F.; MARTÍNEZ-SALAZAR, E.L.; TOBÓN-CASTANO, A. El riñón en la malaria: de La patogénesis a las manifestaciones clínicas. Infectio, v.18, n.3, p.120-128, 2014.

[31] WILAIRATANA, P.; WESTERLUND, E.K.; AURSUDKIJ, B.; VANNAPHAN, S.; KRUDSOOD, S.; VIRIYAVEJAKUL, P.; CHOKEJINDACHAI, W.; TREEPRASERTSUK,

S.; SRISURIYA, P.; GORDEUK, V.R.; BRITTENHAM, G.M. Treatment of malarial acute renal failure by hemodialysis. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v.60, n.2, p.233-237, 1999.

[32] SUIJUN, W.; ZHEN, Y.; YING, G.; YANFANG, W. A role for trans-caryophyllene in the moderation of insulin secretion. *Biochemical and biophysical research communications*, v.444, n.4, p.451-454, 2014.

[33] FERNANDES, E.S.; PASSOS, G.F.; MEDEIROS, R.; DA CUNHA, F.M.; FERREIRA, J.; CAMPOS, M.M.; PIANOWSKI, L.F.; CALIXTO, J.B. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. *European journal of pharmacology*, v.569, n.3, p.228-236, 2007.

[34] AKINOSOGLOU, K.S.; SOLOMOU, E.E.; GOGOS, C.A. Malaria: a haematological disease. *Hematology*, v.17, n.2, p.106-114, 2012.

[35] EKVALL, H. Malaria and anemia. *Current opinion in hematology*, v.10, n.2, p.108-114, 2003.

[36] SOUZA, G.A.; SILVA, N.C.; SOUZA, J.; DE SOUZA, G.A.; DA SILVA, N.C.; DE SOUZA, J.; DE OLIVEIRA, K.R.; DA FONSECA, A.L.; BARATTO, L.C.; DE OLIVEIRA, E.C.; DE PILLA VAROTTI, F.; MORAES, W.P. In vitro and in vivo antimalarial potential of óleo resin obtained from *Copaifera reticulata* Ducke (Fabaceae) in the Brazilian Amazon rain forest. *Phytomedicine*, v.15, n.24, p.111-118, 2017.

[37] HADRI, A.; RIO, M.G.; SANZ, J.; COLOMA, A.G.; IDAOMAR, M.; OZONAS, B.R.; GONZÁLEZ, J.B.; REUS, M.I. Cytotoxicactivity of  $\alpha$ -humulene and transcaryophyllene from *Salvia officinalis* in animal and human tumor cells. *An R Acad Nac Farm*, v.76, n.3, p.343-356, 2010.

[38] PAULA-FREIRE, L.I.; ANDERSEN, M.L.; GAMA, V.S.; MOLSKA, G.R.; CARLINI, E.L. The oral administration of trans-caryophyllene at tenuates acute and chronic pain in mice. *Phytomedicine*, v.21, n.3, p.356-362, 2014.

[39] TEIXEIRA, M.J.M. Profilaxia da Malária em Viajantes. Dissertação (Mestrado em Científica de Infecçiiologia), Universidade de Coimbra, 2016.

[40] OLIVEIRA, C.R. Alterações Hematológicas e perfil fenotípico das células mononucleares do sangue periférico de pacientes com malária por *P. vivax* e *P. falciparum* na fase aguda e de convalescença da infecção. Dissertação (Mestrado em Biologia Parasitária), Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz; 2010.

[41] RÜDIGER, A.L.; SIANI, A.C.; JUNIOR, V.V. The chemistry and pharmacology of the South America genus *Protium* Burm. f. (Bursereaceae). *Pharmacognosy reviews*, v.1, n.1, p.93-104, 2007.