

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS DE
COMPLEXOS DE RUTÊNIO (III) CONJUGADOS COM AS
NAFTOQUINONAS LAPACHOL OU ATOVAQUONA COMO
CANDIDATOS A FÁRMACOS ANTIMALÁRICOS**

CAROLINE CONCEIÇÃO SOUSA

**Salvador - Bahia
2021**

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa**

**AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS DE
COMPLEXOS DE RUTÊNIO (III) CONJUGADOS COM AS
NAFTOQUINONAS LAPACHOL OU ATOVAQUONA COMO
CANDIDATOS A FÁRMACOS ANTIMALÁRICOS**

CAROLINE CONCEIÇÃO SOUSA

Orientador: Dr. Diogo Rodrigo de Magalhães Moreira

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa como requisito para obtenção do título de mestre

**Salvador - Bahia
2021**

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Instituto Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador – Bahia

S725a Sousa, Caroline Conceição.
Avaliação das propriedades farmacológicas de complexos de rutênio (III) conjugados com as naftoquinonas lapachol ou atovaquona como candidatos a fármacos antimaláricos. / Caroline Conceição Sousa. - 2021.
88 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Diogo Rodrigo de Magalhães Moreira, Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia.

Dissertação (Mestrado Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, 2021.

1. Malária. 2. Antiparasitários. 3. Naftoquinonas. 4. Atovaquona.

I. Título.

CDU 616.936

“AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS DE COMPLEXOS DE RUTÊNIO (III) CONJUGADOS COM AS NAFTOQUINONAS LAPACHOL OU ATOVAQUONA COMO CANDIDATOS A FÁRMACOS ANTIMALÁRICOS.”

CAROLINE CONCEIÇÃO SOUSA


FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 26 de janeiro de 2021.

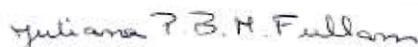
COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. Henrique Rodrigues Marcelino
Professor Adjunto-A
UFBA



Dr Rafael Victorio Carvalho
Guido Professor Associado
USP



Dra. Juliana Perroni Bezerra de Menezes
Fullam
Pesquisadora
IGM/FIOCRUZ

FONTES DE FINANCIAMENTO

Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior – Brasil (CAPES)-
Código de Financiamento 001
Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq
Fundação para Desenvolvimento Científico e Tecnológico em Saúde – FioTec

AGRADECIMENTOS

Aos **meus pais** por todo o apoio e incentivo nos estudos. Por todos os ensinamentos e valores passados, e por todo o amor e compreensão nos tempos difíceis. Amo vocês!

Ao **meu irmão** pelos bons momentos. Mesmo ficando meses sem nos vermos, nada muda.

Ao meu orientador **Dr. Diogo Moreira** por todo o apoio e ensinamentos nessa jornada acadêmica, além dos conselhos que levo para a vida.

À **Prof. Nicoletta Basilico** da Università degli Studi di Milano (Milão, Itália) e a doutoranda Helenita Costa Quadros pela realização dos ensaios com o *Plasmodium falciparum*.

Ao **Prof. Antonio Carlos Doriguetto, Dra. Marília Imaculada Frazão Barbosa** e a **Dra. Júlia Scaff Moreira Dias** do Departamento de Química da Universidade Federal de Alfenas (MG, Brasil) pela realização da síntese e envio dos derivados da Atovaquona e Lapachol com a fosfina.

Ao **Prof. Alzir Azevedo Batista** e o **Dr. João Honorato de Araújo Neto** do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (SP, Brasil) pela realização da síntese e envio dos derivados da Atovaquona e Lapachol com a terpiridina.

À **Vice-Presidência de Educação, Informação e Comunicação (VPEIC)** da Fiocruz pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao **suporte financeiro do Programa INOVA Fiocruz** através do projeto VPPCB-008-FIO-18-2-15 aprovado no edital Geração de Conhecimento - Novos Talentos.

Aos meus amigos da Fiocruz, **Breno, Sara, Renan, Rômulo, Mariana, Adrielle, Larissa, Cássio, Tatiana**. Pelo carinho e os bons momentos de descontração.

À minha amiga **Lene** pela companhia e paciência. Sua amizade nesses últimos meses tornou tudo mais leve.

Aos **colegas do LETI** que contribuíram diretamente para o meu crescimento e por tonarem o laboratório um ambiente sempre leve e agradável para trabalhar.

Aos **meus amigos de São Miguel e da UNEB** que nunca me abandonaram e continuam me apoiando em todas as minhas decisões. Obrigada pelas lindas palavras nos melhores e piores momentos.

Às minhas amigas **Gabriela e Jéssica** por todos os momentos incríveis nesse ano de 2020. O apoio foi virtual, mas muito importante no meu crescimento pessoal.

À **Biblioteca** e todos os colaboradores, pelo auxílio nos estudos e na finalização da dissertação.

À **Fiocruz** pela estrutura e por possibilitar a realização desse trabalho.

SOUSA, Caroline Conceição. Avaliação das propriedades farmacológicas de complexos de rutênio (III) conjugados com as naftoquinonas lapachol ou atovaquona como candidatos a fármacos antimaláricos. 2021. 88 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2021.

RESUMO

INTRODUÇÃO: A malária é uma doença complexa e infecciosa que afeta milhões de pessoas em todo o mundo, principalmente em países da África, Ásia, regiões mediterrâneas e América do Sul. O surgimento de cepas resistentes aos antimaláricos agravou o quadro, tornando urgente a busca e o desenvolvimento de novos candidatos a antimaláricos. Nosso grupo de pesquisa tem pesquisado a atividade antiparasitária de compostos metálicos complexados com moléculas naturais e antimaláricas nos últimos anos. **OBJETIVO:** Investigar atividade antiplasmodial de derivados rutênio-naftoquinona baseados na atovaquona e lapachol. **MATERIAIS E MÉTODOS:** Neste trabalho, quatro compostos de rutênio-naftoquinona foram estudados para avaliar atividade antiplasmodial *in vitro* e *in vivo*: Derivado 1, Derivado 2, conjugados de rutênio-atovaquona; Derivado 3 e derivado 4, conjugados de rutênio-lapachol. **RESULTADOS:** A atividade antiparasitária contra as cepas de *P. falciparum* (3d7, D10 e W2) demonstraram que os derivados 1 e 2 são mais potentes que os derivados 3 e 4, com valores de IC₅₀ na faixa nanomolar e baixa toxicidade para culturas de células de mamíferos (J774 e HepG2). Os derivados 1 e 2 também foram testados com glutatona reduzida, e o Derivado 1 exibiu melhor desempenho, dando indícios de que tais complexos podem agir na via de GSH. Em um modelo antiparasitário *in vivo*, o Derivado 1 (15,6 µmol/Kg) suprimiu a parasitemia e exibiu um perfil semelhante ao do medicamento de referência (atovaquona 15,6 µmol/Kg). O Derivado 2, testado em duas doses diferentes (15,6 µmol/Kg e 46,7 µmol/Kg), reduziu a parasitemia apenas na dose mais alta. A supressão da parasitemia refletiu na taxa de sobrevivência dos animais tratados, que foi consideravelmente maior do que o grupo não-tratado. **CONCLUSÃO:** Nossos resultados demonstraram que os compostos de rutênio-naftoquinona são candidatos eficazes e promissores para a quimioterapia da malária, sendo o Derivado 1 (rutênio-atovaquona) o composto que exibiu melhor perfil antiparasitário.

Palavras-chave: Malária, Antiparasitários, Naftoquinonas, Lapachol, Atovaquona, Complexos metálicos.

SOUSA, Caroline Conceição. Evaluation of the pharmacological properties of ruthenium (III) complexes combined with naphthoquinones lapachol or atovaquone as candidates for antimalarial drugs. 2021. 88 f. Dissertation (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2021.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Malaria is a complex and infectious disease that affects millions of people worldwide, mainly in countries in Africa, Asia, Mediterranean regions, and South America. The emergence of strains resistant to antimalarial drugs has worsened the scenario, making the search for and development of new antimalarial candidates an urgent task. Our research group have been searching for the antiparasitic activity of metallic compounds complexed with natural and antimalarial molecules in recent years. **AIM:** This work aims to investigate the antimalarial activity of the ruthenium-naphthoquinone derivatives atovaquone and lapachol based. **MATERIALS AND METHODS:** In this work, four ruthenium-naphthoquinone compounds were studied to evaluate *in vitro* and *in vivo* antimalarial activity: Derivative 1, Derivative 2, ruthenium-atovaquone conjugates; Derivative 3 and Derivative 4, ruthenium-lapachol conjugates. **RESULTS:** The antiparasitic activity against *P. falciparum* strains (3d7, D10 and W2) and Derivative 1 and 2 are more potent than the Derivative 3 and 4, with IC₅₀ values in nanomolar range and low toxicity to mammalian cells cultures (J774 and HepG2). Derivatives 1 and 2 also were tested with reduced glutathione, and Derivative 1 exhibited better performance, giving indications of these complex acts in the GSH pathway. In an *in vivo* antiparasitic model, Derivative 1 (15,6 µmol/Kg) suppressed parasitemia and exhibited a similar profile to the reference drug (atovaquone 15,6 µmol/Kg). Derivative 2, tested in two different doses (15,6 µmol/Kg e 46,7 µmol/Kg), reduced parasitemia only in the highest dose. The suppression of parasitemia has reflected in the survival rate of treated animals, which was considerable higher than the untreated group. **CONCLUSION:** Our results demonstrated that ruthenium-naphthoquinone compounds are effective and promising candidates for malaria chemotherapy.

Key words: Malaria, Antiparasitics, Naphthoquinones, Lapachol, Atovaquone, Metal complexes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Taxa de incidência prevista de casos de malária por <i>P. falciparum</i> no ano de 2019	18
Figura 2. Ciclo biológico do plasmódio nos diferentes tecidos	19
Figura 3. Processo de digestão da hemoglobina no vacúolo digestivo do plasmódio dentro do eritrócito infectado.....	10
Figura 4. Estruturas químicas da quinina, cloroquina e artemisinina.....	23
Figura 5. Panorama de países que reportaram falha terapêutica para a arteméter/lumefantrina em 2019	27
Figura 6. Estruturas químicas da ubibuinona e Atovaquona	27
Figura 7. Cadeia respiratória mitocondrial no plasmódio.....	28
Figura 8. Mecanismo de ação e resistência do plasmódio à atovaquona e proguanil	30
Figura 9. Estruturas químicas do lapachol, α -lapachona e β -lapachona	34
Figura 10. Complexos metálicos rutênio-cloroquina.....	37
Figura 11. Eficácia de complexo metálico platina-cloroquina (WV-93).....	37
Figura 12. Esquema representativo dos processos de ativação celular mediado pela glutathione no plasmódio	40
Figura 13. Esquema representativo dos processos de ativação celular nos complexos metálicos	42
Figura 14. Estrutura química do lapachol e regiões de coordenação com rutênio ..	43
Figura 15. Evolução cronológica no desenvolvimento químico que culminou com a descoberta da Atovaquona	44
Figura 16. Estruturas químicas do Lapachol, Plasmodiona e Atovaquona e ligação da Atovaquona ao sítio de ação.....	45
Figura 17. Estruturas químicas do lapachol (LAP), Atovaquona (ATO) e dos complexos metálicos estudados	47
Figura 18. Caracterização química do complexo [(RuCl ₂ (ato)(dppb)]	50
Figura 19. Esquema representativo da metodologia de viabilidade celular	51
Figura 20. Avaliação de potencial hemolítico	60
Figura 21. Avaliação de ligação com glutathione reduzida.....	62
Figura 22. Avaliação da eficácia do Derivado 1 em camundongos infectados	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Terapia combinada utilizada para a malária não-complicada baseada na artemisinina e seus derivados	26
Tabela 2. Atividade citostática frente ao estágio sanguíneo (3D7, D10 e W2), citotoxicidade em células de mamíferos (J774 e HepG2) e índice de seletividade dos Derivados 1 e 2.....	58
Tabela 3. Atividade citostática frente ao estágio sanguíneo (3D7, D10 e W2), citotoxicidade em células de mamíferos (J774 e HepG2) e índice de seletividade do lapachol, Derivado 3 e Derivado 4.....	59
Tabela 4. Percentual de redução da parasitemia, mediana e taxa de sobrevivência de Derivado 1	65
Tabela 5. Percentual de redução da parasitemia, mediana e taxa de sobrevivência do Derivado 2	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ATO	Atovaquona
ATP	Adenosina trifosfato
CC₅₀	Concentração citotóxica de 50%
CO₂	Dióxido de carbono
CYP2C19	Proteína enzimática do citocromo P450
DHODH	Dihidroratato desidrogenase
DHFR	Diidrofolato redutase do plasmódio
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FDA	Food and Drug Organization
Fe (II)	Ferro (II)
Fe (III)	Ferro (III)
GFP	Proteína verde fluorescente
G3PDH	glicerol 3-fosfato desidrogenase
GSH	Glutaciona reduzida
GSSG	Glutaciona oxidada
hGR	Glutaciona redutase humana
CI₅₀	Concentração inibitória de 50%
IFN-γ	Interferon-gama
IgG	Imunoglobulina G
I.S.	Índice de Seletividade
LAP	Lapachol
MQO	Malato quinona oxiredutase
PfCYTb	mutação no citocromo b do <i>Plasmodium falciparum</i>
NDH2	Quinona oxidoreductase de tipo II
OMS	Organização Mundial de Saúde
<i>P. berghei</i>	<i>Plasmodium berghei</i>
<i>P. falciparum</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
PBS	Tampão fosfato-salino
PfCRT	proteína de transporte transmembrana do <i>P. falciparum</i>

	cloroquina resistente
PfGR	Glutathione reductase do <i>Plasmodium falciparum</i>
RNA	Ácido ribonucleico
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
Ru (II)	Rutênio (II)
Ru (III)	Rutênio (III)
SDH	Succinato desidrogenase
TCA	Terapia combinada baseada na artemisinina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17
2.1	MALÁRIA.....	17
2.2	QUIMIOTERAPIA ANTIMALÁRICA – CONTEXTO HISTÓRICO E TRATAMENTO ATUAL.....	22
2.3	A MITOCÔNDRIA COMO ALVO DE ANTIMALÁRICOS	31
2.4	QUINONAS: HISTÓRICO, OCORRÊNCIA E IMPORTÂNCIA COMO PRODUTOS NATURAIS	33
2.5	COMPLEXOS METÁLICOS BASEADOS EM RUTÊNIO: FONTE DE DESENVOLVIMENTO FARMACÊUTICO	36
2.6	PROCESSO DE ATIVAÇÃO CELULAR DE FÁRMACOS ANTIMALÁRICOS..	39
2.7	NAFTOQUINONAS COMO COMPONENTES PARA O DESENVOLVIMENTO DE COMPLEXOS METÁLICOS.....	42
3	OBJETIVOS	49
3.1	GERAIS	49
3.2	ESPECÍFICOS.....	49
4	MATERIAIS E MÉTODOS	50
4.1	SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA	50
4.2	ENSAIO DE CITOTOXICIDADE	51
4.3	CRESCIMENTO PARASITÁRIO DE CEPAS DO <i>P. FALCIPARUM</i>	52
4.3.1	AValiação de atividade antiplasmodial <i>IN VITRO</i> frente à cepas do <i>P. FALCIPARUM</i>	52
4.4	ENSAIO DE HEMÓLISE	53
4.5	ENSAIO DE LIGAÇÃO COM A GLUTATIONA REDUZIDA.....	53
4.6	ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA <i>IN VIVO</i>	54
4.7	PROPOSTA DE ANÁLISE	55

5	RESULTADOS	56
5.1	COMPLEXOS METÁLICOS NÃO SÃO CITOTÓXICOS E POSSUEM ATIVIDADE ANTIPLASMODIAL <i>IN VITRO</i>	56
5.2	COMPLEXOS METÁLICOS COM ATOVAQUONA NÃO INDUZEM HEMÓLISE E SE LIGAM A GLUTATIONA REDUZIDA	60
5.3	AVALIAÇÃO <i>IN VIVO DE</i> ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA.....	63
6	DISCUSSÃO	68
7	CONCLUSÃO	73
	REFERÊNCIAS	74

1 INTRODUÇÃO

A malária é uma doença parasitária e infecciosa complexa que tem como agente patológico protozoários do gênero *Plasmodium spp.*

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), no ano de 2019, foram registrados 229 milhões de casos de malária, com maior número de notificações no continente africano (WHO, 2020). A alta taxa de mortalidade está associada a dificuldade em combater as diversas formas evolutivas do parasito e o surgimento de cepas cada vez mais resistentes às terapias antimaláricas atuais (SKRZYPEK et al., 2017). Portanto, é necessária a busca e desenvolvimento de fármacos que ajam de forma efetiva nessa doença.

Dentre as moléculas que vêm sendo estudadas nesses últimos ano, as naftoquinonas tem ganhado destaque pelas suas propriedades antiplasmodial e estabilidade química, que permite fazer substituições e/ou complexações com outras moléculas e metais, aumentando, assim, atividade frente ao plasmódio. O lapachol e Atovaquona são duas das naftoquinonas mais conhecidas e estudadas. O lapachol é uma molécula de origem natural que apresenta atividade em alvos específicos do parasito. Enquanto a Atovaquona é uma naftoquinona sintética, estruturalmente relacionada ao lapachol, e bastante potente nos estágios sanguíneos e hepáticos do ciclo biológico do parasito, agindo na cadeia respiratória do parasito e afetando outras estruturas (SILVA et al., 2016). O lapachol e seus análogos apresentam mecanismo similar, por possuírem o mesmo núcleo naftoquinônico.

No entanto, o surgimento de cepas resistentes do plasmódio a múltiplos fármacos é o grande desafio da comunidade científica. Com isso, a associação de metais de transição na estrutura de fármacos é comumente aplicada com finalidade de potencializar os efeitos farmacológicos. Dentre os metais de transição, o rutênio é considerado um dos mais adequados do ponto de vista químico-farmacêutico para o desenvolvimento de fármacos por apresentar solubilidade em meios aquosos e permitir atravessar membranas (OLIVEIRA et al., 2017). Além disso, o rutênio potencializa atividade antimalárica de compostos quando associado a outros antimaláricos (MACEDO et al., 2016). A associação de

naftoquinonas com rutênio apresenta maior atividade que as moléculas base, quando testadas em células tumorais e parasitos do gênero *Leishmania spp.* e *Plasmodium spp* (BARBOSA et al., 2014). Mesmo apresentando atividade antimalárica em modelos experimentais, ainda não está totalmente elucidado o mecanismo de ação de complexos metálicos baseados em rutênio-naftoquinona.

Diante disso, a busca de opções terapêuticas contendo naftoquinonas e rutênio tende a ser uma alternativa na pesquisa de novos fármacos. Julgando que atualmente já se tem notícias de plasmódios resistentes aos medicamentos utilizados na clínica, os complexos metálicos contendo rutênio em suas estruturas podem ser tidos como compostos potencialmente úteis na malária, ou por reverter o problema da resistência ou por atuarem em todos os estagio evolutivos do ciclo de vida do plasmódio.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 MALÁRIA

A malária é uma doença causada por protozoários do gênero *Plasmodium*, e transmitidos pela fêmea do mosquito do gênero *Anopheles*. Existem cinco espécies que infectam humanos *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae*, *P. knowlesi*, sendo o *Plasmodium falciparum* o que está envolvido nos casos mais graves de malária, seguido pelo *Plasmodium vivax* (NLINWE et. al, 2018).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), no ano de 2019 foram registrados 229 milhões de casos de malária no mundo. O maior número de casos de malária é proveniente de países do continente africano (95%), seguido do sudeste asiático (3%) e a região mediterrânea oriental (2%) (Figura 1) (WHO, 2020). No Brasil, é observado um maior número de ocorrências nas regiões da Amazônia legal (SIMÕES et al., 2014; SIQUEIRA et al., 2016; BRASIL, 2020). No ano de 2017 foram registrados na região amazônica 128.747 casos de malária, com mais de 1.500 internações e aproximadamente 20 óbitos, sendo essas infecções acometidas, principalmente, pelo *P. vivax*, seguido pelo *P. falciparum* (BRASIL, 2020). A maior concentração de casos de malária na região norte do Brasil é devido às condições climáticas e geográficas necessárias para a sobrevivência e reprodução do mosquito *Anopheles*, como umidade, temperatura, pressão atmosférica, altitude específica (KELLY-HOPE et al., 2009; DAHER et al., 2019; WOLFARTH-COUTO et al., 2020).

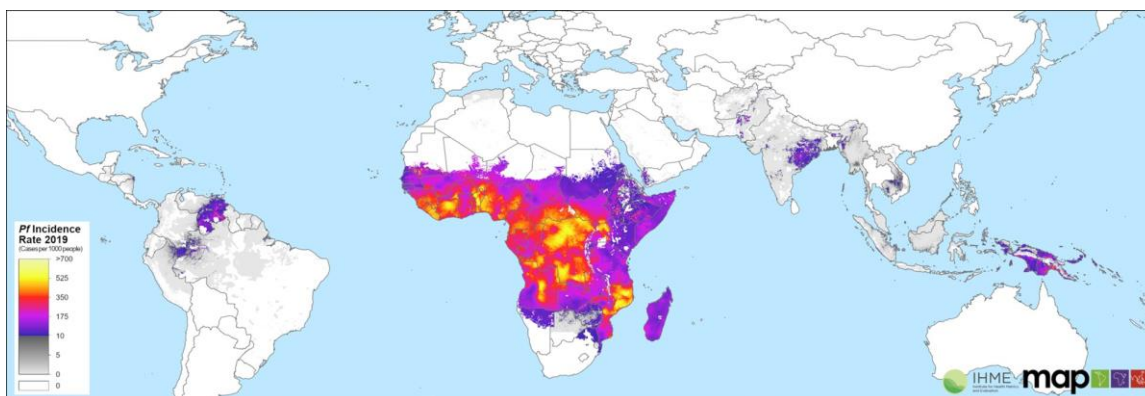


Figura 1: Taxa de incidência prevista de casos de malária por *P. falciparum* no ano de 2019. As taxas são baseadas em casos clínicos para 1.000 habitantes. A diferenciação de cores corresponde ao percentual de ocorrência, com escala de zero a 10 casos por 1.000 (tons cinza) e de 10 a 1.000 (roxo a amarelo). Imagem extraída de <[www. https://malariaatlas.org](https://malariaatlas.org)>.

O ciclo biológico do plasmódio é complexo e envolve várias formas evolutivas. Para o desenvolvimento do parasito, este necessita de um hospedeiro vertebrado, onde ocorre o ciclo assexuado, e outro invertebrado, para ciclo sexuado. Os hospedeiros vertebrados podem ser mamíferos, répteis ou aves; enquanto os invertebrados podem ser mosquitos do gênero *Lutzomya*, *Culex*, *Aedes* e *Culiseta*. Nas infecções que acometem humanos o vetor é o mosquito fêmea do gênero *Anopheles* (NJABO et al., 2010; SCHALL, 2011).

No homem, a infecção é iniciada no momento do repasto sanguíneo, quando o mosquito anofelino fêmea infectado inocula os esporozoítos presentes nas glândulas salivares. Os parasitos rapidamente penetram os vasos sanguíneos e migram diretamente para o fígado, não se mantendo por muito tempo no local o qual foi inoculado (Figura 2). O estágio hepático é essencial no ciclo de vida do plasmódio. No fígado, os esporozoítos invadem os hepatócitos, local onde irão se transformar na forma infectante sanguínea, os merozoítos. Um único esporozoíto pode dar origem a milhares de merozoítos, os quais, posteriormente, irão migrar para corrente sanguínea e infectar os eritrócitos (COWMAN et al., 2016).

As espécies *P. vivax* e *P. ovale* possuem uma forma evolutiva diferente das outras, os hipnozoítos. Estas formas do parasito são capazes de se manter latentes no fígado por curtos ou longos períodos de tempo, podendo ser responsáveis por

recidivas em pacientes que apresentaram infecções anteriormente (MARKUS, 2015). Uma vez no hepatócito, o parasito passará por reprodução assexuada, denominada esquizogonia pré-eritrocítica, o qual ocorre replicação de DNA e organização de organelas do parasito, resultando no esquizonte hepático. A partir disso, a membrana plasmática do parasito inicia um processo de invaginação ao redor dessas organelas, dando origem aos merozoítos (STANWAY et al., 2011; LANGHORNE et al., 2016).

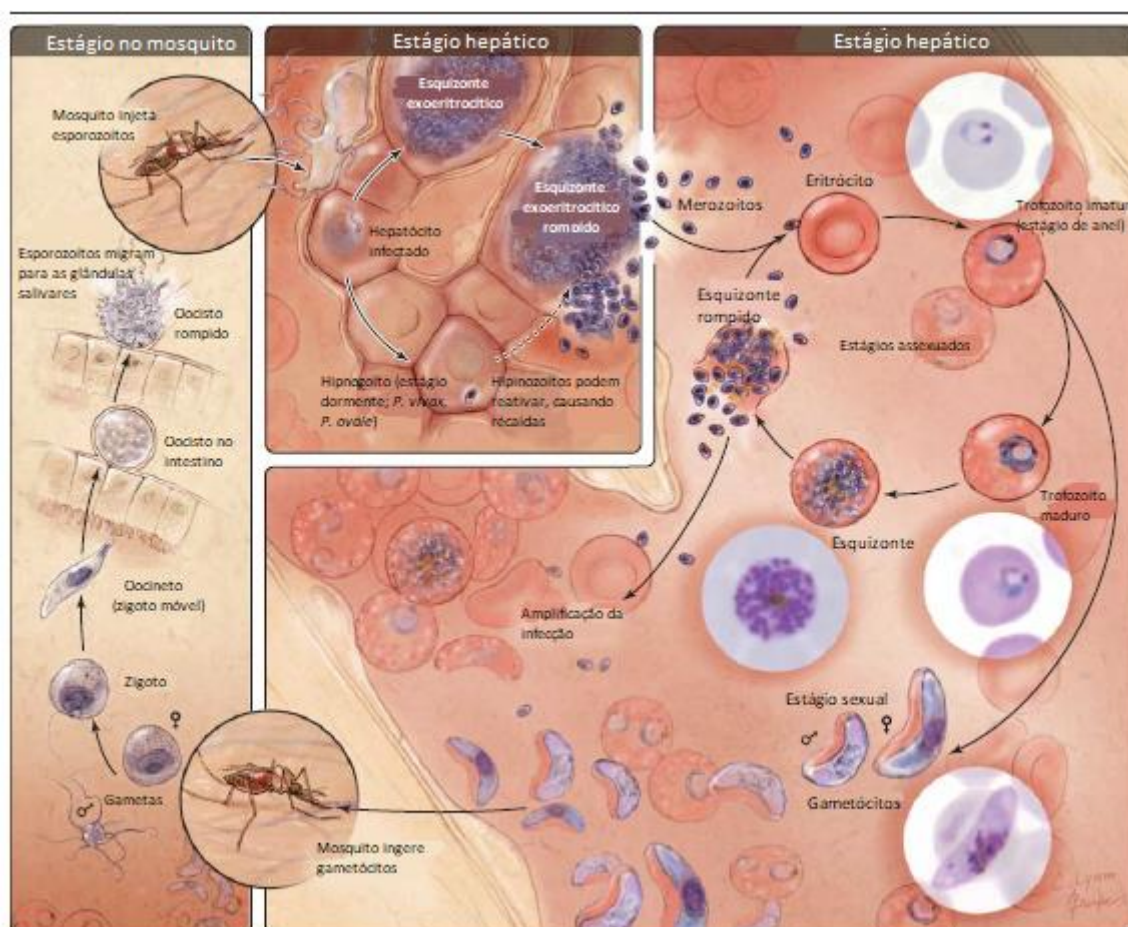


Figura 2: Ciclo biológico do plasmódio nos diferentes tecidos. Imagem ilustrativa das formas evolutivas que se desenvolvem no mosquito anofelino, estágios hepáticos e estágios sanguíneo (Adaptado de Griffith et al., 2007).

Durante o ciclo hepático não há manifestação de sintomas, sendo observados apenas na fase eritrocítica. Após a formação dos merozoítos, vesículas parasitadas (merossomos) rompem liberando estas formas evolutivas para a corrente sanguínea. Uma vez estabelecida a infecção eritrocítica, os parasitos se diferenciam em

trofozoíto jovem (anéis), trofozoíto maduro, esquizontes sanguíneos e, posteriormente, merozoítos, os quais irão romper a membrana eritrocitária e liberar os parasitos para infectar novas células (SARAF et al., 2016).

É durante a fase sanguínea que são observados o surgimento dos sintomas. Após a invasão do merozoíto ao eritrócito, o plasmódio rapidamente se desenvolve para a forma de anel, a qual é marcada pela baixa atividade metabólica. Cerca de aproximadamente 20 horas após invasão, o plasmódio passa para o estágio de trofozoíto, que tem como característica a síntese de DNA e RNA, além da digestão da hemoglobina, sendo esta última fonte de aminoácidos do parasito. A digestão da hemoglobina ocorre no vacúolo digestivo do parasito, compartimento do tipo lisossomal com pH ácido, o qual é favorável para ativação de proteases e início o processo. No início da digestão, o plasmódio consome apenas a porção proteica da hemoglobina, sendo a porção contendo Fe (II) (heme) rapidamente polimerizada ao cristal inerte hemozoína. Assim que o heme é liberado, o pH ácido e o oxigênio presentes no vacúolo digestivo resulta no rápido processo de oxidação para Fe (III) hematina, a qual é tóxica para o parasito. Para contornar tal toxicidade, o parasito cristaliza a hematina, seu principal processo de desintoxicação, em hemozoína, a qual não é tóxica para o parasito (Figura 3) (LAZARUS et al., 2008; MÜLLER et al., 2011). A inibição da cristalização da hematina é um dos principais alvos de fármacos antimaláricos (FAMIN; GINSBURG, 2002; GLANS et al., 2012).

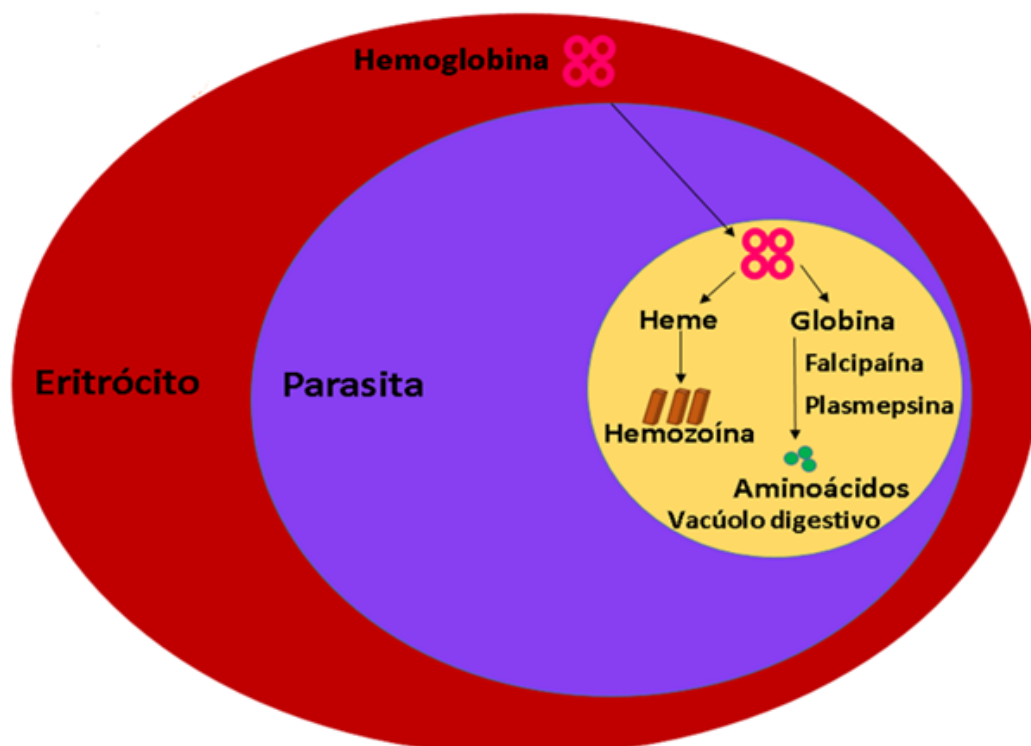


Figura 3: Processo de digestão da hemoglobina no vacúolo digestivo do plasmódio dentro do eritrócito infectado. O parasito consome a hemoglobina do eritrócito consumindo a porção proteica (globina), a qual é catabolizada por proteinases (falcipaina e plasmepsina), e dão origem à aminoácidos. O heme liberado, o qual é tóxico para o parasito, é rapidamente cristalizado em hemozoína. (Adaptado de CORONADO et al., 2014).

Uma pequena fração de merozoítos liberados no estágio sanguíneo, cerca de 0,1%-5%, se diferenciam em gametas masculinos e femininos (gametócitos) (MEIBALAN et al., 2019). É nesse estágio que o parasito se torna infectante para o vetor, o qual, durante repasto sanguíneo, ingere sangue infectado e inicia a fase sexuada. No mosquito, os gametócitos irão para o intestino do anofelino, local que possui as condições adequadas para diferenciação em microgametócito (masculino) e macrogametócito (feminino), como temperatura abaixo de 30°C e pH aumentado devido à baixa pressão de dióxido de carbono (CO₂). Logo após, ocorre a fecundação e mitose, resultando no zigoto. O zigoto se aloja na parede do intestino do mosquito, se diferencia em oocineto, depois em oocisto. Este último rompe a membrana e libera milhares de esporozoítos que irão se alojar nas glândulas salivares do anofelino, podendo iniciar um novo ciclo quando realizar o repasto sanguíneo (COWMAN et al., 2016; MEIBALAN et al., 2019).

O rompimento das hemácias infectadas e posterior liberação dos merozoítos é o que caracteriza os acessos febris da malária. Isso ocorre devido à grande quantidade de eritrócitos rompidos, aumento da parasitemia e liberação da hemozoína na corrente sanguínea, resultando em episódios de febre alta e calafrios (KOCH, et al., 2016). Os ciclos febris variam para cada espécie. No *P. falciparum* e *P. vivax* o ciclo dura 48 horas, enquanto para o *P. malarie* tem um ciclo de 72 horas, apresentando os episódios de febre a cada 4 dias. Na malária complicada, esses acessos febris podem apresentar sintomas mais graves como hipoglicemia, convulsões, náuseas, vômito, distúrbios de consciência, insuficiência renal e coma (malária cerebral). Dessa forma, o diagnóstico deve ser realizado com antecedência, para que o paciente com suspeita de malária não evolua para quadro mais grave da doença (LUZOLO et al., 2018).

2.2 QUIMIOTERAPIA ANTIMALÁRICA – CONTEXTO HISTÓRICO E TRATAMENTO ATUAL

O tratamento para a malária é conhecido muito antes da identificação do ciclo de vida do parasito. No século XVII padres jesuítas que vieram juntamente com colonizadores europeus observaram a utilização popular de chás e bebidas por indígenas. Estes chás eram preparados com a casca da *Cinchona sp.* para o tratamento de alguns tipos de febre (CUNICO et al., 2008). O principal componente ativo dessa árvore é um alcaloide, a quinina. Tal fato foi comprovado em 1820 por Pierre Pelletier e Joseph Caventau a partir do isolamento de vários alcaloides ativos. Um ano após o descobrimento da quinina, esta começou a ser comercializada com o nome de “pó-dos-jesuítas” (DESPOMMIER et al., 2017.).

O desenvolvimento de fármacos antimaláricos está bastante associado com os períodos de guerra. As tropas que estavam a frente desses conflitos sofriam com as epidemias da malária e para isso necessitavam de alternativas que os protegessem. Durante a Primeira Guerra Mundial, a quinina era o fármaco utilizado contra a malária. Porém, com a dificuldade na obtenção da casca da *Cinchona*, a Alemanha buscou sintetizar moléculas com atividade antimalárica, como a 9-aminoacrinidina (atabrina), a qual foi sintetizada na década de 20 e comercializada em 1930. Durante a Segunda Guerra Mundial, os Estados Unidos começaram fabricar a atabrina americana devido à dificuldade de obtenção da matéria-prima para extração da Quinina. A atabrina americana foi administrada em soldados americanos e aliados como profilaxia. Entretanto, foram observados efeitos adversos e psicológicos o que fez suspender o seu uso (WALLACE, 1989; FRANÇA, et al., 2008).

A dificuldade de obtenção do quinina impulsionou a pesquisa de novas moléculas ativas contra o plasmódio. Fármacos como amodiaquina, primaquina, pirimetamina e cloroquina foram sintetizados. A cloroquina, então, tornou-se o fármaco de primeira escolha devido ao baixo custo, tolerância, segurança e baixa toxicidade. Foi durante a Guerra do Vietnã que soldados apresentaram casos de malária resistentes à cloroquina, o que incentivou a busca de alternativas que fossem eficazes em casos com cepas resistentes. Com isso, a mefloquina e a halofantrina foram aprovadas pela *Food and Drug Administration* (FDA) (SKRZYPEK et al., 2017).

Algumas 4-aminoquinolinas, como cloroquina, quinina, amodiaquina, mefloquina, e 8-aminoquinolinas, como primaquina e tafenoquina, podem agir tanto nas formas evolutivas assexuadas quanto nos gametócitos (KUMAR et al., 2015). A primeira linha de tratamento era a cloroquina, a qual atua como esquizonticida, não apresentando efeitos adversos graves, permitindo a adoção como profilaxia em áreas endêmicas. Características farmacológicas da cloroquina, como estabilidade, baixo custo e eficácia, resultou na grande utilização desse medicamento e aumento significativo de cepas resistentes. O mecanismo de resistência do plasmódio à cloroquina está associado a mutações na proteína de transporte transmembrana do *P. falciparum* resistente à cloroquina (PfCRT), localizada na membrana do vacúolo digestivo, diminuindo, assim, a concentração do fármaco nesse compartimento (OLAFSON et al., 2017).

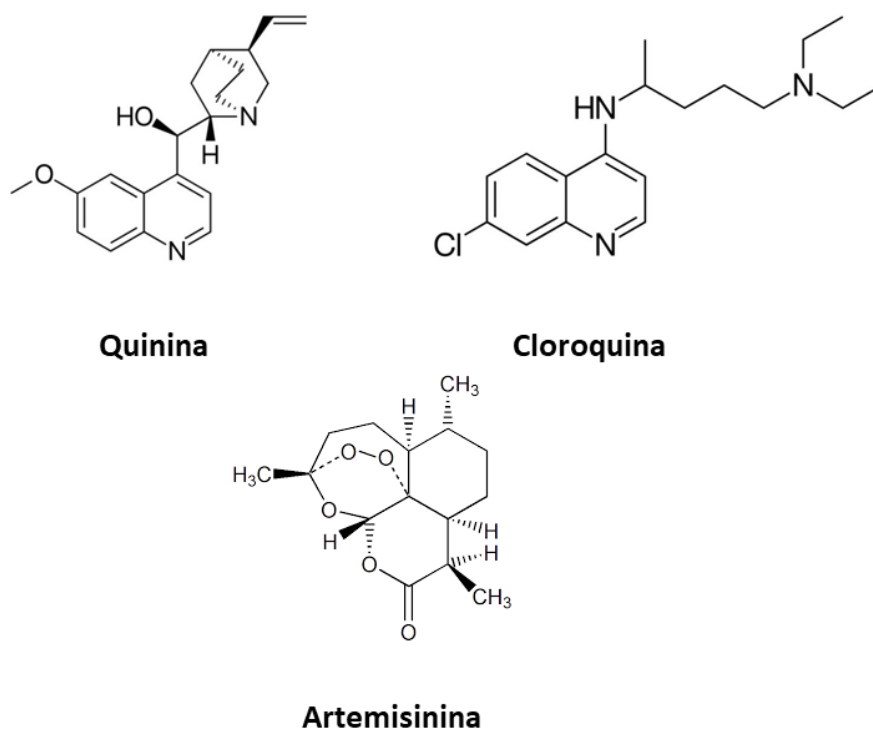


Figura 4: Estruturas químicas da quinina, cloroquina e artemisinina.

O mecanismo de ação das 4-aminoquinolinas e 8-aminoquinolinas é baseado na inibição da polimerização da hemozoína. As aminoquinolinas se ligam à hematina durante o processo de metabolização da hemoglobina, impedindo a formação dos cristais inertes e resultando na morte do parasito pelo o acúmulo desse metabólito no vacúolo digestivo (PAGOLA et al., 2000; OLAFSON et al., 2015). Algumas 8-aminoquinolinas, como primaquina e tafenoquina, podem agir tanto nas formas evolutivas assexuadas quanto nos gametócitos. A primaquina é um exemplo de fármaco que age dessa forma, sendo utilizada em associação com esquizotocidas sanguíneos devido sua ação frente às formas evolutivas latentes (hipnozoítos) do *P. vivax* e *P. ovale* (SULLIVAN, 2017).

O rápido aumento no número de cepas resistentes desencadeou na busca de outras alternativas terapêuticas eficazes e que não desenvolvessem resistência no parasito. Com isso, a mefloquina foi adotada para o tratamento da malária com parasitos resistentes a cloroquina. A mefloquina é um potente esquizotocida sanguíneo e seus efeitos farmacológicos resultam na regressão da parasitemia e os sintomas. O mecanismo de ação não está completamente elucidado, mas acredita-se que pode agir durante o processo de cristalização da hemozoína. Mesmo possuindo características farmacológicas interessantes, foi observado o surgimento de cepas também resistentes a mefloquina (PRICE et al., 2004).

Com o contínuo surgimento de cepas resistentes à quininas, a artemisinina surgiu como uma opção promissora. É um produto natural extraído da *Artemisia annua* utilizada na antiguidade pelos chineses para febres. Na década de 70 foi isolada e descoberta sua ação antimalárica, e utilizada para tratar malária em homens que estavam participando da guerra no Vietnã. A partir disso, a artemisinina serviu como base para a síntese de novos compostos análogos à sua estrutura, como artesunato, diidroartemisinina, arteméter (LA-SCALEA et al., 2007).

A artemisinina e seus derivados (artesunato, ácido artenílico, diidroartemisinina) surgiram como alternativas para contornar o contínuo aparecimento de plasmódios resistentes às terapias utilizadas (TU, 2011). A eficácia da artemisinina é proveniente da rápida ação supressora da parasitemia agindo nas formas evolutivas sanguíneas, além dos gametócitos e, quando associada a outros antimaláricos, pode eliminar a infecção. Os efeitos farmacológicos da artemisinina e

seus derivados estão diretamente associados à presença de uma ponte endoperóxido na estrutura química desses fármacos. Essa característica estrutural permite que a molécula seja reduzida pelo íon ferroso, presente no heme, durante a digestão da hemoglobina. No vacúolo digestivo a artemisinina é clivada, dando origem a radicais livres que podem modificar estruturas proteicas dos parasitos por alquilação (MESHNICK, 2002). Em um estudo realizado por La-Scalea et al. (2007) demonstrou alterações no comportamento voltimétrico na presença de hemina quando tratada com artemisinina, confirmando, assim, que ocorre redução da molécula na presença de um agente redutor, no caso o íon Fe^{+2} .

O tratamento da malária, atualmente, é baseado em terapias combinadas, onde o principal objetivo é combater o plasmódio por mais de um alvo bioquímico (WHO, 2020). Com isso, a OMS preconizou algumas combinações de medicamentos que ajam por vias metabólicas diferentes combatendo o protozoário e diminuindo o risco de desenvolver resistência individual para cada fármaco. Então, pela eficácia comprovada da artemisinina e seus derivados, foi adotada a terapia combinada baseada na artemisinina (TCA), em que é utilizada a artemisinina ou seus derivados associados com um ou mais fármacos (Tabela 1). A artemisinina e os seus derivados não podem ser utilizados como monoterapia oral. Formulações de dose fixa (combinação de dois princípios ativos diferentes em um único comprimido) são mais recomendadas do que o uso de vários comprimidos ou cápsulas, uma vez que facilitam a adesão ao tratamento (WHO, 2020).

Tabela 1: Terapia combinada utilizada para a malária não-complicada baseada na artemisinina e seus derivados.

Terapia combinada
Arteméter + lumefantrina
Artesunato + amodiaquina
Artesunato + mefloquina
Diidroartemisinina + piperaquina
Artesunato + sulfadoxina - pirimetamina

Fonte: *Guidelines for the treatment of malaria* 3ª edição, 2015

Mesmo apresentando eficácia frente ao plasmódio, ainda é existente a preocupação quanto à resistência do protozoário. Dados da OMS, apontam o surgimento de falhas terapêuticas em pacientes que faziam uso de TCAs em diversos países (Figura 5), inclusive o Brasil, o qual apresentou cepas de *P. falciparum* resistentes ao esquema arteméter/lumefantrina e artesunato/mefloquina entre 2015 e 2017 (WHO, 2020).

A atovaquona é uma hidroxinaftoquinona estruturalmente semelhante a ubiquinona e age inibindo seletivamente o transporte de elétrons na mitocôndria no complexo *bc1* (Figura 7). Tal inibição resulta na perda da função mitocondrial do parasito, já que este processo ocorre no estágio sanguíneo, e necessita dessa função importante para sobrevivência. Durante o estágio eritrocítico, a mitocôndria tem como principal função o fornecimento de orotato para síntese de pirimidina através da atividade da diidroorotato desidrogenase (DHODH). Por se assemelhar estruturalmente com a ubiquinona, a atovaquona acaba por inibir o complexo citocromo *bc1* do parasito, tendo como alvo o compartimento de oxidação do ubiquinol (Q_0) (SIREGAR et al., 2015). Consequentemente, o complexo *bc1* é afetado, resultando na inibição de metabólitos necessários para via da pirimidina (MATHER et al., 2005; PAINTER et al., 2007).

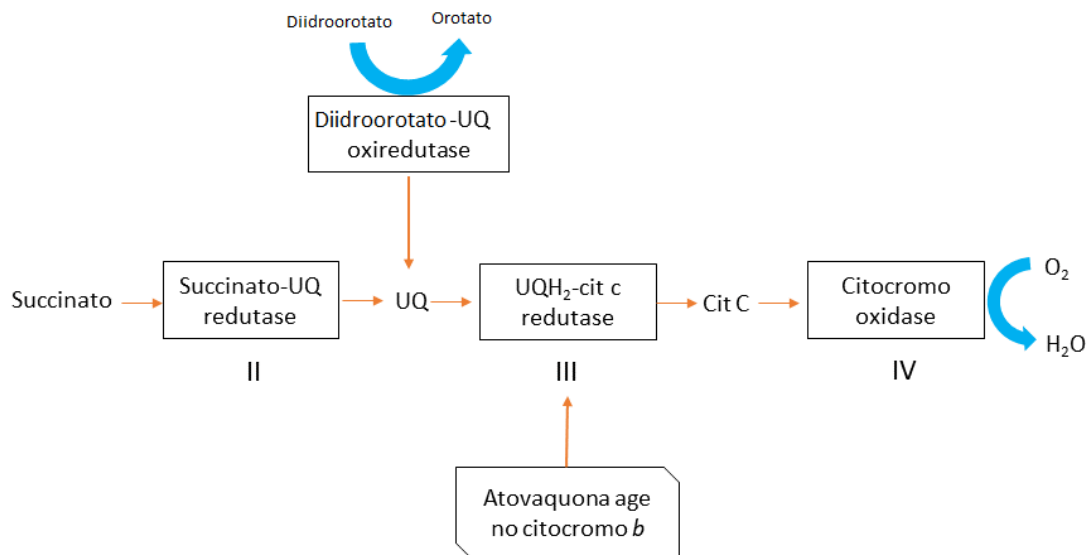
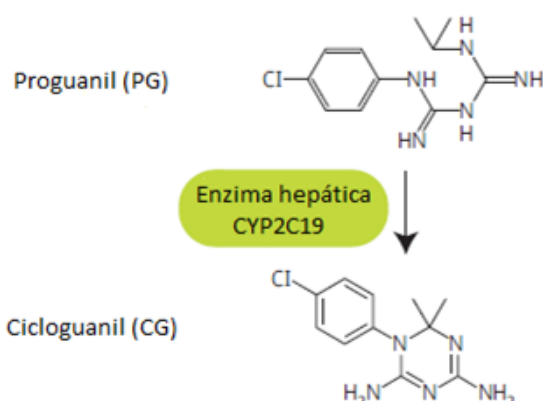


Figura 7: Cadeia respiratória mitocondrial no plasmódio. A cadeia respiratória mitocondrial do parasito é composta pelo complexo II (succinato-ubiquinona redutase), III (quinol-citocromo *c* redutase), IV (citocromo *c* oxidase) e diidroorotato desidrogenase (DHODH). A ubiquinona é o principal componente na cadeia elétrica mitocondrial do plasmódio. É a interseção entre o metabolismo da biossíntese da pirimidina e metabolismo energético. A atovaquona age nessa cadeia energética, se ligando ao citocromo *b* e, consequentemente, impede a transferência de elétrons entre a ubiquinona e as enzimas mitocondriais (Imagem adaptada de SIREGAR et al., 2015).

A atovaquona inibe seletivamente o transporte de elétrons mitocondrial parasita. Embora a resistência se desenvolva rapidamente quando a atovaquona é usada como um agente único contra a malária por *Plasmodium falciparum*, em combinação com proguanil (uma biguanida), sua atividade é aumentada, reduzindo assim a probabilidade de surgimento de resistência (SIREGAR et al., 2015).

Com a adoção da atovaquona como monoterapia no tratamento para malária, houve consequente surgimento de cepas de parasitos resistentes (SRIVASTAVA; VAIDYA, 1999). Então, com a necessidade de contornar tal resistência, o proguanil foi adotado como coadjuvante no tratamento, com a apresentação o medicamento Malarone® (atovaquona 250 mg/ proguanil 100 mg). O proguanil não tem ação antiparasitária potente quando usado sozinho, mas aumenta a capacidade da atovaquona em colapsar a membrana mitocondrial do plasmódio, provavelmente por um mecanismo de sinergismo (Figura 8) (FOOTE et al., 1990; SIREGAR et al., 2015). A administração da associação atovaquona/proguanil precisa ser feita pela via oral, já que o proguanil necessita do metabolismo hepático de primeira passagem pra se tornar ativo. Com isso, o proguanil é convertido em cicloguanil a qual sofre metabolização pelo sistema hepático CYP2C19 e, a partir disto, inibe a diidrofolato redutase do parasita (DHFR), essencial para a produção de folato e a replicação do parasito (FÄRNERT et al., 2003; THAPAR et al., 2003).

Fígado do hospedeiro



Mitocôndria do plasmódio

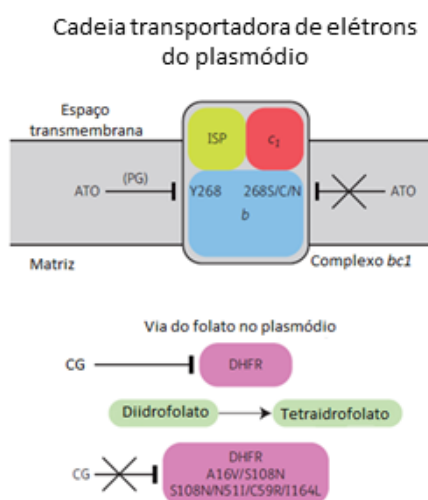


Figura 8: Mecanismo de ação e resistência do plasmódio à Atovaquona e proguanil. A Atovaquona tem como alvo o citocromo *b* do complexo *bc1*, o qual é formado pelos citocromos *b* e *c1* e a proteína ferro-enxofre de Rieske (ISP), na cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria do plasmódio. Essa cadeia de transporte está localizada na membrana íterna da mitocôndria, entre o espaço intermembrana e a matriz. A atividade da Atovaquona é diminuída quando ocorre mutações no citocromo *b* (Y226S/C/N). A Atovaquona atua em sinergia com o proguanil. O proguanil precisa ser metabolizado no fígado pela enzima CYP2C19 para sua forma ativa, o cicloguanil. O cicloguanil tem como alvo a enzima DHFR na via do folato do parasito. A atividade do cicloguanil é reduzida quando ocorre mutações na DHFR, incluindo A16V/S108N e S108N/N511/C59R/I164L. (Imagem extraída de STAINES et al., 2018).

A atovaquona é altamente lipofílica e possui baixa solubilidade em água. É um fármaco pouco absorvido pelo estômago, sendo aconselhável a administração com alimentos gordurosos, o que resulta no aumento das concentrações plasmáticas em aproximadamente 5 vezes. O tempo de meia-vida da atovaquona é relativamente longo, podendo alcançar 87 horas após a administração (MCKAGE; SCOTT, 2003). Tal característica é importante na manutenção dos níveis plasmáticos do fármaco no paciente.

Mesmo adotando a estratégia de associação da atovaquona com o proguanil, ainda é visto surgimento de parasitos resistentes à essa terapia. Dentre os mecanismos que podem influenciar na eficácia do tratamento, mutações no citocromo *b* do *Plasmodium falciparum* (PfCYTb) são os mais recorrentes e causam resistência do plasmódio a atovaquona. A resistência ao cicloguanil são provenientes de mutações na DHFR, mas também polimorfismos na CYP2C19 do hospedeiro pode influenciar nas concentrações de cicloguanil sérico (PAINTER et al., 2007; SIREGAR et al., 2015).

Em suma, os medicamentos atualmente utilizados apresentam eficácia para o tratamento da malária. Porém, é visto cada vez mais comum o aumento e disseminação de parasitos multirresistentes aos medicamentos antimaláricos, sendo necessário, assim, a busca de alternativas terapêuticas eficazes, com ação em múltiplos estágios do parasito e com baixa toxicidade.

2.3 A MITOCÔNDRIA COMO ALVO DE ANTIMALÁRICOS

Como dito anteriormente, a mitocôndria pode ser um interessante alvo terapêutico para fármacos antimaláricos. Essa organela está envolvida no transporte de elétrons do parasito, biossíntese de pirimidina e conseqüente síntese de DNA, processos necessários para a sobrevivência do plasmódio. A mitocôndria do plasmódio possui diferenças moleculares e funcionais em comparação com as mitocôndrias de células humanas, diferenças essas que torna essa organela um alvo interessante para a química medicinal.

Na cadeia transportadora de elétrons do plasmódio existe cinco desidrogenases que servem como doadoras de elétrons para a ubiquinona,

resultando em ubiquinol (ubiquinona reduzida), são estes NDH2 (NADH desidrogenase tipo II), diidroorotato desidrogenase (DHOD), malato quinona oxireductase (MQO), succinato desidrogenase (SDH) e glicerol 3-fosfato desidrogenase (G3PDH). No complexo mitocondrial *bc1* o ubiquinol reduzido é oxidado novamente para ubiquinona. O NADH2 é considerado um alvo promissor no para o desenvolvimento de fármacos antimaláricos, pois esta é uma flavoenzima ligada a membrana da mitocôndria, que cataliza a transferência de elétrons do NADH para quinona, resultando em NAD⁺ e quinol (NIXON et al., 2013; KE et al., 2018). A grande vantagem no direcionamento de fármacos para esse alvo está no fato de não estar presente em humanos. A mitocôndria humana possui uma NADH desidrogenase tipo I que possui 45 subunidades e bombeia prótons através da membrana mitocondrial interna ao mesmo tempo que ocorre a transferência de elétrons. Por outro lado, o plasmódio possui uma NADH desidrogenase tipo II (NDH2), uma subunidade única responsável por bombear prótons na membrana mitocondrial do parasito (BIAGIN et al., 2006; KE et al., 2018).

Outro alvo molecular estudado no desenvolvimento de fármacos antimaláricos é a DHOD. Na cadeia transportadora de elétrons, a DHOD está envolvida na biossíntese de pirimidina, o qual é essencial para a sobrevivência do parasito. Durante o estágio sanguíneo, o parasito está em sua fase metabolicamente mais ativa e necessita de energia glicolítica para que ocorra o processo de biossíntese de pirimidina, a qual é essencial para síntese de DNA e RNA, fosfolipídios e glicoproteínas (PHILLIPS et al., 2015).

A cadeia transportadora de elétrons mitocondrial do plasmódio é um alvo interessante para o desenvolvimento de fármacos no combate da malária. As diferenças estruturais entre a mitocôndria humana e a do parasito permitem que os fármacos sejam seletivos quando possuem a mitocôndria como sítio de ação. Desse modo, fármacos que possuam a mitocôndria como local de ação podem agir em múltiplos alvos ao longo da cadeia transportadora de elétrons e resultar na morte do parasito e diminuição da parasitemia de indivíduos infectados.

2.4 QUINONAS: HISTÓRICO, OCORRÊNCIA E IMPORTÂNCIA COMO PRODUTOS NATURAIS

As quinonas fazem parte de uma classe de compostos comuns em vários produtos naturais e bioquímicos endógenos. Possuem uma estrutura química com características importantes na transferência de elétrons, as quais são essenciais para os seres vivos (SILVA et al., 2003).

Na antiguidade, as quinonas eram utilizadas como antieméticos e purgantes. As propriedades farmacológicas das quinonas estão, muitas vezes, ligadas a subclasse que se encontra como, por exemplo, as antraquinonas presentes nas plantas do gênero *Senna* são responsáveis por seus efeitos laxativos. Sabe-se também que as quinonas possuem propriedades antitumoral, antiparasitária, antibacteriana (BRANDELLI et al., 2004; JARDIM et al., 2015; RAJASEKAR et al., 2019), além de serem componentes importantes nas cadeias de transporte de elétrons na respiração celular e fotossíntese, como plastoquinonas e a menaquinona (vitamina K) (COX et al., 1966; MONKS et al., 2002; BOLTON et al., 2016).

As quinonas são metabólitos secundários provenientes da via de síntese do ácido chiquímico em uma grande variedade de plantas. Nos seres humanos não ocorre diretamente a síntese dessas moléculas, porém há exposição a partir do metabolismo oxidativo de catecolaminas e estrógenos, onde os seus subprodutos são quinonas (BOLTON et al., 2000). A principal característica química dessa classe de moléculas é presença de anéis aromáticos com duas carbonilas, podendo estas estarem adjacentes ou separadas no anel (KUMAGAI et al., 2012). As quinonas são classificadas de acordo com derivações do sistema aromático parental como, por exemplo, as benzoquinonas derivadas do benzeno, antraquinonas de antraceno e naftoquinonas derivadas de naftaleno. Além disso, esses ativos possuem propriedade redox, que podem sofrer ciclos redox enzimáticos pelo citocromo p450, e não enzimático, gerando radicais superóxidos (CARNEIRO et al., 2016).

Dentre as quinonas que se tem conhecimento, as naftoquinonas têm sido de grande interesse na busca de alternativas terapêuticas para diversas doenças. São metabólitos secundários de ocorrência natural encontrados na família bignoniaceae e são facilmente encontradas em corantes, cosméticos, alimentos e em extratos

para fins medicinais, como antimicrobiano, antitumoral e anti-inflamatórios (JÁCOME et al., 1999).

Entre os compostos naftoquinoidais obtidos a partir de produtos naturais, destaca-se o lapachol (2-hidroxi-3-(e-metil-2-butenil)-1,4-naftoquinona), uma naftoquinona que têm recebido atenção considerável por suas propriedades anti-inflamatórias, antitumorais e antiparasitárias. Essa molécula está presente em grande parte de plantas do gênero *Tabebuia*, popularmente chamada de Ipê (SILVA et al., 2003). Tanto o lapachol quanto seus derivados, tendo destaque os isômeros α -lapachona e β -lapachona (Figura 9), mostraram ação citotóxica contra linhagens de células tumorais (BOOTHMAN, 1989; JARDIM, et al., 2015).

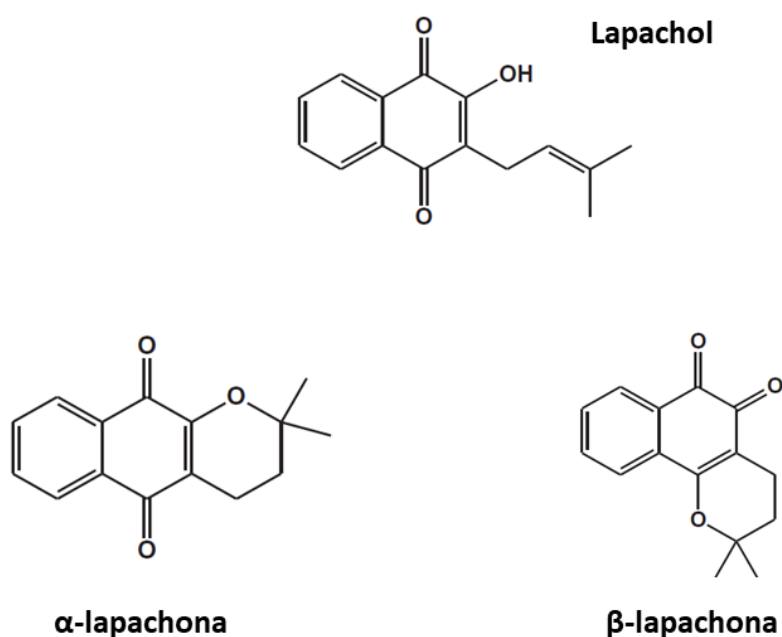


Figura 9: Estruturas químicas do lapachol, α -lapachona e β -lapachona. Imagens extraídas de MOREIRA et al, 2014.

O lapachol, assim como outras naftoquinonas, possuem características estruturais que possibilitam a complexação com outras estruturas. Podem se ligar aos íons metálicos em diferentes estados de oxidação, como quinona (oxidada), como semi-quinona (semi-reduzida) e como hidroxiquinona (reduzida) (ORAMAS-

ROYO et al., 2013). Estudos mostraram que a complexação do lapachol com íons metálicos aumentou a ação antiparasitária promastigotas de *L. amazonensis*, além de inibir a proliferação destes parasitos (BARBOSA et al., 2014; SOUZA et al., 2014).

Um estudo realizado por Moreira et al. em 2014 demonstrou atividade antiparasitária do lapachol e seus derivados frente à cepas de *P. falciparum*, inibindo a maturação das formas de anéis para trofozoítos. Além disso, pode-se observar que não induziu hemólise em concentrações até 200 µM. Tal versatilidade permite que as quinonas ajam nos sistemas biológicos, aumentando a chance de ligar-se aos receptores específicos com baixo risco de toxicidade.

Outra naftoquinona bastante estudada é a 2-hidroxi-1,4-naftoquinona, também conhecida como lausona. A lausona é uma das naftoquinonas naturais mais antigas que se tem notícia. Essa molécula é o principal bioativo do extrato da *Lawsonia inermis* (Henna). Das propriedades bioativas que se tem conhecimento sobre a lausona destacam-se as anti-inflamatórias e antimicrobianas, como demonstrado por Alia et al. (1995) em que o extrato etanólico da *L. inermis* reduziu edema e inflamação em ratos após 2 e 4 horas pós administração. Bem como inibiu a produção de superóxido aniônico frente a neutrófilos humanos (LIOU et al., 2013). Por outro lado, também foi observado ação da lausona frente a patógenos humanos como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* e *Plasmodium sp.* (ISMAIL et al., 2014; AFOLAYAN et al., 2016).

A atovaquona é uma hidroxi-1,4-naftoquinona sintética usada no tratamento da malária não-complicada em associação com o proguanil. A atovaquona se relaciona estruturalmente ao lapachol e apresenta potência frente a cepas de plasmódio *in vitro* e eficácia *in vivo* nas fases eritrocíticas e hepática (BRANDÃO et al., 2017). Durante o desenvolvimento desse fármaco, foi observada atividade frente ao *P. falciparum in vitro* na concentração de ~1nM. Além disso, Müller et al. (2011) demonstrou que 1,4 – naftoquinonas podem agir inibindo a glutathione redutase no *P. falciparum*, a qual tem papel essencial na proteção do parasito contra radicais livres, resultando no desequilíbrio da homeostase elétrica no citosol do parasito e inibindo a cristalização da hemozoína.

Em suma, as quinonas são uma classe de moléculas promissoras. Apresentam atividade antitumoral, anti-inflamatória, antibacteriana, antifúngica e antiparasitária, sendo assim ponto de partida para o desenvolvimento de novos fármacos com potencial antimalárico.

2.5 COMPLEXOS METÁLICOS BASEADOS EM RUTÊNIO: FONTE DE DESENVOLVIMENTO FARMACÊUTICO

Desde a introdução da cisplatina no tratamento do câncer, o desenvolvimento de compostos à base de metal vem ganhando espaço na investigação de alternativas terapêuticas para diversas doenças. Os complexos de rutênio têm sido amplamente pesquisados como agentes antitumorais, antibacterianos e antiparasitários promissores. Eles apresentam mecanismos de ação distintos associados à baixa toxicidade que possibilita a adoção como alternativa terapêutica (TABRIZI et al., 2016).

Nos últimos anos, complexos organometálicos de Ru (II) despertaram atenção na pesquisa. Tal interesse está associado à capacidade de ser complexado com compostos orgânicos com importância medicinal, seja por coordenação direta ao centro metálico ou pela funcionalização de um ligante, com objetivo de melhorar o valor terapêutico (OLIVEIRA et al., 2017). O uso de estruturas privilegiadas no desenvolvimento de novos fármacos tem sido uma abordagem eficaz no planejamento de novos medicamentos. Essas estruturas muitas vezes são fármacos, compostos naturais ou moléculas bioativas com propriedades promissoras ou com semelhança estrutural ao fármaco já usado no tratamento de patologias (Figura 10) (GLANS et al., 2012).

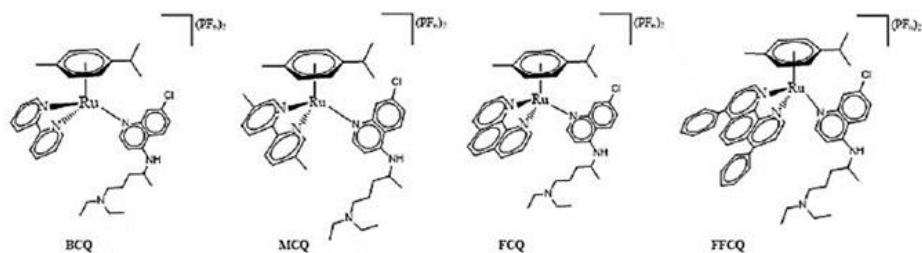


Figura 10: Complexos metálicos rutênio-cloroquina. Estruturas químicas de organometálicos testados anteriormente por nosso grupo. Imagem extraída de MACEDO et al, 2016.

A associação de estruturas privilegiadas com metais pode aumentar a potência do complexo resultante a partir do sinergismo entre a biomolécula e o metal, melhorando a atividade biológica. Dentre as moléculas amplamente estudadas, compostos derivados da quinina apresentam grande versatilidade. A solubilidade dos complexos metálicos depende do íon metálico utilizado e a natureza dos ligantes associados. O complexo metálico deve ser solúvel em água e apresentar lipofilicidade adequada para atravessar as membranas celulares (DHANARA et al., 2015).

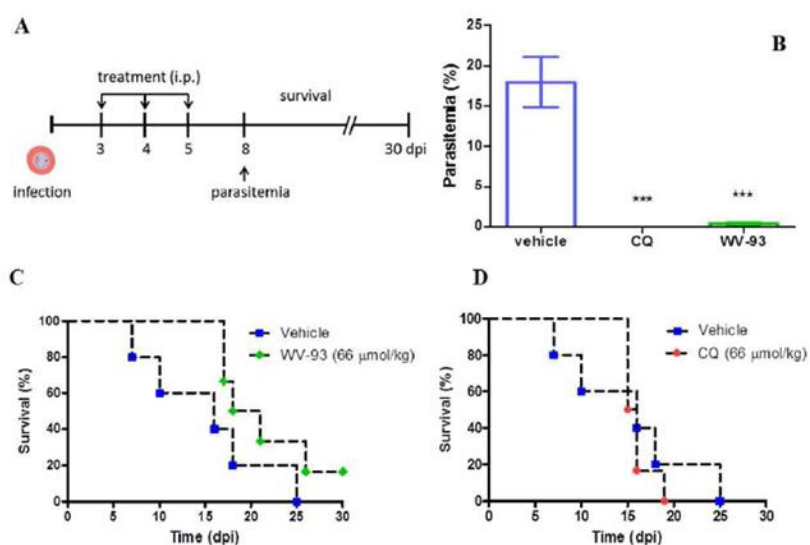


Figura 11: Eficácia de complexo metálico platina-cloroquina (WV-93). Desenho experimental de Thompson (A), percentual de parasitemia (B) e sobrevivência dos animais (C, D). Em (B) WV-93 suprimiu a parasitemia semelhante a Cloroquina (CQ). Ao mesmo tempo que aumentou o tempo de vida dos animais (C, D) em comparação ao grupo veículo e CQ. No painel (B), os valores representam o média \pm D.P. de um experimento. *** $p < 0,01$ versus veículo (One way ANOVA e teste de Newman-Keuls). dpi = dias após infecção. Ensaio *in vivo* realizado por Macedo et al. (2017)

Complexos de Ru (II) possuem atividade antiparasitária promissora em modelos *in vitro* e *in vivo* (Figura 11) por se tornarem reativos em pH ácido e em ambientes com níveis elevados de glutatona, conferindo à molécula seletividade entre células de mamíferos saudáveis e os parasitos (NEVES et al., 2019).

A atividade antimalárica de vários complexos metálicos tem sido demonstrada eficaz no tratamento contra cepas resistentes de plasmódio *in vitro* (BARBOSA et al., 2014; KUPPUSAMY et al., 2016). Macedo et al. (2016) observou que a complexação do rutênio com a cloroquina tem ação antimalárica mais acentuada em cepas resistentes, em comparação ao metal livre e a cloroquina. A presença do metal potencializa o efeito esperado podendo agir em vias diferentes das já conhecidas, como a inibição da formação de cristais de hemozoína. Em 2016, Martinez et al. testou um composto híbrido que possuía rutenoceno, trioxano e uma 4-aminoquinolona contra *P. falciparum*. O composto foi sete vezes mais ativo que a cloroquina em cepas resistentes demonstrando, assim, a presença do metal na estrutura aumenta atividade antiparasitária.

Substâncias contendo naftoquinonas em sua estrutura desempenha atividade relacionada à geração de espécies reativas de oxigênio por ciclo redox (NEVES et al., 2019). A inserção íons metálicos pode modular as propriedades das naftoquinonas, representando, assim, uma estratégia atraente no desenvolvimento de novos fármacos. Em 2003, Gokhale et al. realizou um estudo com complexos metálicos com a naftoquinona buparvaquona, e evidenciou que tal associação é uma alternativa como novos agentes antimaláricos potentes. Este trabalho foi o primeiro exemplo de complexo metálico com naftoquinonas antimaláricas.

Dessa forma, a associação de compostos naftoquinônicos com íons metálicos torna-se uma estratégia capaz de potencializar a ação antiparasitária dessas moléculas. Contudo, os mecanismos celulares e moleculares de complexos rutênio-

naftoquinona não estão totalmente elucidados, sendo necessária a investigação dos possíveis mecanismos de ação de tais complexos no plasmódio, bem como avaliar a seletividade frente à células de mamíferos.

2.6 PROCESSO DE ATIVAÇÃO CELULAR DE FÁRMACOS ANTIMALÁRICOS

O processo de ativação de fármacos antimaláricos é uma etapa essencial para garantir o acúmulo do antimalárico no ambiente celular e posterior transporte ao seu alvo molecular. Um dos primeiros e mais conhecidos processos de ativação de antimalárico é o caso da cloroquina, que ao permear no vacúolo digestivo do plasmódio, encontra um ambiente ácido, sofre uma etapa de protonação e forma uma espécie $(CQ-H)^{2+}$. Por conta da carga, a cloroquina protonada possui permeabilidade reduzida em atravessar membranas celulares e, como resultado, o efluxo da cloroquina para fora do vacúolo digestivo é impedido; conseqüentemente a cloroquina se acumula no vacúolo digestivo e exerce ação antimalárica (SLATER, 1993). Mas com exceção da cloroquina, a maioria dos fármacos antimaláricos sofrem o processo de ativação mediado por substâncias endógenas. Algumas das substâncias de maior abundância nos eritrócitos e no plasmódio são o heme, a glutatona e a hemoglobina e, portanto, são os primeiros mediadores da interação de fármacos no ambiente celular, sendo responsáveis pelo processo de ativação (KASOZI et al., 2013; SICILIANO et al., 2017; MOHRING et al., 2017). Enquanto que o heme e a hemoglobina podem atuar como mediadores do processo de ativação, a glutatona pode atuar tanto na ativação quanto na inativação de uma substância antimalárica (Figura 12), visto que a glutatona possui papel antioxidante no parasito (MÜLLER, 2015).

As artemisininas se ligam ao heme livre ou ao heme presente na hemoglobina de maneira covalente e irreversível, formando um conjugado heme-artemisinina que então exerce ação antiparasitária (MA et al., 2020). A quinolina antimalárica amodiaquina interage com a glutathione, formando metabólitos que também estão envolvidos com a ação antimalárica (GARAVITO et al., 2007), enquanto que a primaquina é ativada *in vitro* pela glutathione, *in vivo* a esta sofre extensa metabolização hepática formando metabólitos bioativos (CAMARDA et al., 2019). Embora muitos antimaláricos sofram o processo de ativação celular, em relação a atovaquona sabe-se que não há interação com a glutathione nem com o heme (GARAVITO et al., 2007; COMBRINCK et al., 2015), portanto, o processo de ativação celular da Atovaquona ainda não foi totalmente desvendado.

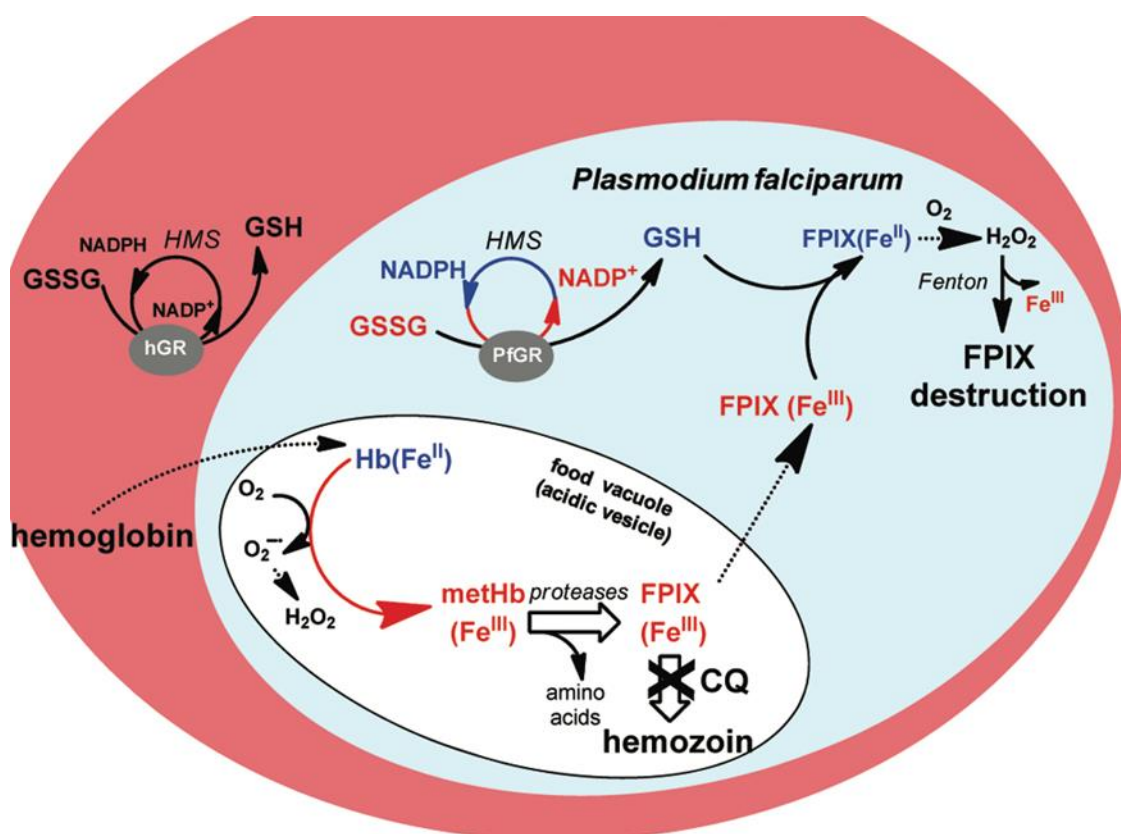


Figura 12: Esquema representativo dos processos de ativação celular mediado pela glutathione no plasmódio. GSH = glutathione reduzida; GSSG = glutathione oxidada; PfGR = glutathione redutase do *P. falciparum*. hGR = glutathione redutase humana. Figura extraída de Müller et al (2011).

Em relação a ativação celular de complexos metálicos, há dois principais mecanismos operantes (Figura 13). No mecanismo I, ocorre uma hidrólise seguida de troca do ligante por uma substância endógena, sem, todavia, haver a alteração no estado de oxidação do átomo de metal (HOLTKAMP et al., 2018). O mecanismo I é tipicamente observado em complexos com metais de baixo estado de oxidação, tais como complexos com rutênio (II), platina (II) e ouro (I). Já no mecanismo II, ocorre uma alteração no estado de oxidação do átomo de metal, sendo acompanhado de liberação de ligante ou de troca de ligantes. O mecanismo II é tipicamente observado em complexos com metais de estado de oxidação alto, tais como complexos com rutênio (III), platina (IV) e ouro (III) (CHEN et al., 2020). Mais especificamente, os complexos de rutênio (III) seguem o mecanismo II, por apresentarem estado de oxidação mais alto, podendo sofrer redução no meio celular, e resultar em complexos de rutênio (II). É importante frisar que complexos com rutênio (III) podem sofrer mecanismo I de ativação celular. Durante a redução de Ru (III) à Ru (II) no meio celular, pode haver a oxidação de proteínas e outras moléculas endógenas, contribuindo para o efeito farmacológico dos complexos de rutênio (III). Além disso, complexos de rutênio (III) podem sofrer a troca de ligantes, liberando um ligante de importância biológica, tais como substâncias com propriedades citotóxicas ou antiparasitários. Portanto, de uma maneira geral, complexos de rutênio (III) são considerados como pró-fármacos (WEBB et al., 2013; MATCZUK et al., 2014) e modelos mais aceitáveis para o desenvolvimento de fármacos que necessitam a liberação controlada de moléculas antimaláricas.

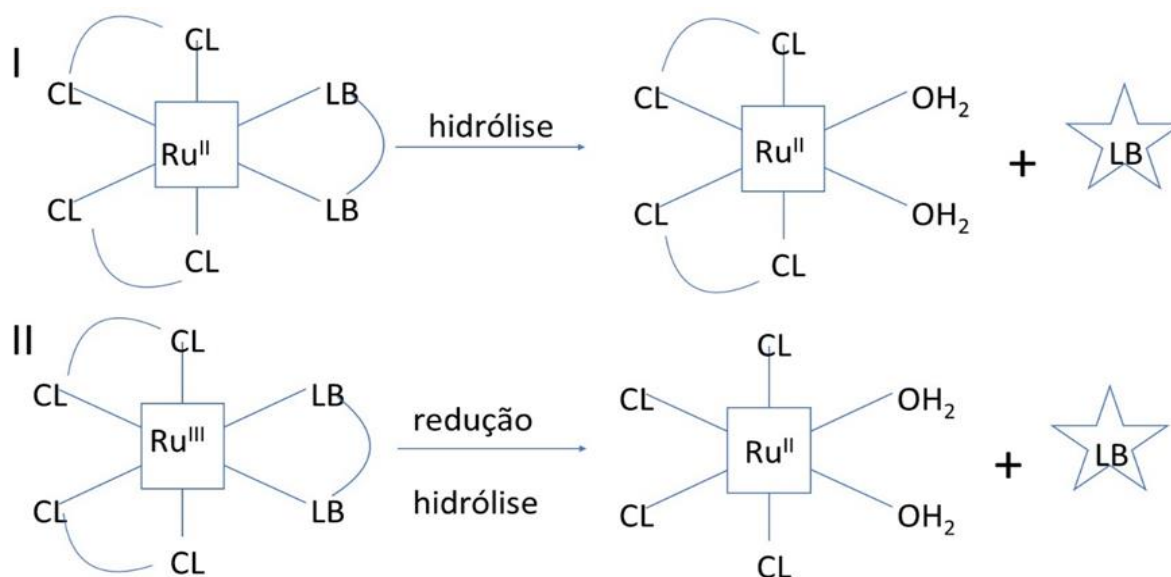


Figura 13: Esquema representativo dos processos de ativação celular nos complexos metálicos. M = metal de transição; LB = ligante biologicamente ativo; CL = co-ligante;

2.7 NAFTOQUINONAS COMO COMPONENTES PARA O DESENVOLVIMENTO DE COMPLEXOS METÁLICOS

As quinonas representam uma classe química ampla e abundante presente em produtos naturais e como substâncias endógenas nas células. Mas do ponto de vista farmacêutico, as naftoquinonas são as mais atrativas por apresentarem menor reatividade química do que as benzoquinonas (QIU et al., 2017; MEYER et al., 2020).

Dentre as naftoquinonas de ocorrência natural, podemos citar o lapachol e seus derivados do tipo lapachona (α -lapachona e β -lapachona), os quais são encontrados em diversas plantas no Brasil (LEMOS et al., 2007). O lapachol, de fato, possui potencial como quimioterápico para o tratamento de doenças infecciosas (MATA-SANTOS et al., 2015; ARAÚJO et al., 2019; LINZNER et al., 2020).

Entretanto, sua eficácia é muito baixa e seu uso clínico foi interrompido. Por conta de sua singularidade química, o lapachol tem sido amplamente investigado como um protótipo químico para a síntese de novas moléculas potencialmente úteis ao tratamento de doenças infecciosas, inclusive contra a malária (ANDRADE-NETO et al., 2004; SHARMA et al., 2013; SOUZA et al., 2014; BRANDÃO et al., 2018; SCHUCK et al., 2013; NASCIMENTO et al., 2020). Nosso grupo de pesquisa tem estudado ao longo dos anos o lapachol e seus derivados como quimioterápico para o tratamento de doenças infecciosas e oncológicas (MOREIRA et al., 2014; BARBOSA et al., 2014; DIAS et al., 2018).

Mais especificamente, em 2014, nosso grupo identificou que complexos metálicos de rutênio de estado de oxidação II ou III contendo o lapachol apresentaram atividade antiparasitária *in vitro* frente a *Leishmania amazonensis* e *Plasmodium falciparum* com potência superior ao Lapachol (BARBOSA et al., 2014) (Figura 14). Um aspecto importante revelado neste trabalho é que o complexo de rutênio (III) contendo o lapachol foi o mais potente antiparasitário e menos citotóxico para células mamíferos do que complexos (II). Embora este complexo tenha sido menos potente que o fármaco de referência (cloroquina), também apresentou potência baixa quando posteriormente testado frente à um painel de cepas do *Plasmodium falciparum* com perfis diferentes de resistência.

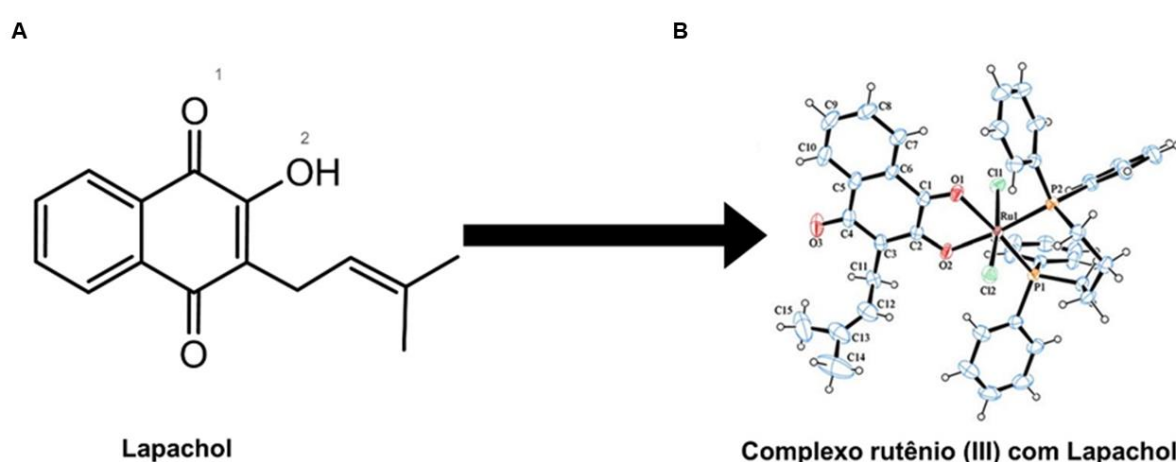


Figura 14: Estrutura química do lapachol e regiões de coordenação com rutênio. Estrutura química do lapachol, denotando numericamente os átomos que se coordenam ao átomo de rutênio (**A**). Estrutura cristalográfica do complexo de rutênio (III) com lapachol de fórmula $[RuCl_2(Lap)(dppb)]$ no qual foi identificado como o composto mais potente como antiparasitários (**B**).

Diante deste achado, nosso grupo de pesquisa decidiu direcionar o estudo de complexos metálicos de rutênio (III) ao invés de rutênio (II), além de investigar o papel da naftoquinona presente na composição destes complexos metálicos. Neste contexto, decidimos incluir como objeto de estudo a atovaquona (Figura 15). Embora até o momento não haja relatos na literatura da atovaquona como componente de complexos metálicos, esse fármaco possui uma estrutura química semelhante ao lapachol e, portanto, factível de se ligar à átomos metálicos de transição, tais como o rutênio. Portanto nosso grupo de pesquisa objetivou o uso da atovaquona como componente (ligante) em complexos metálicos.

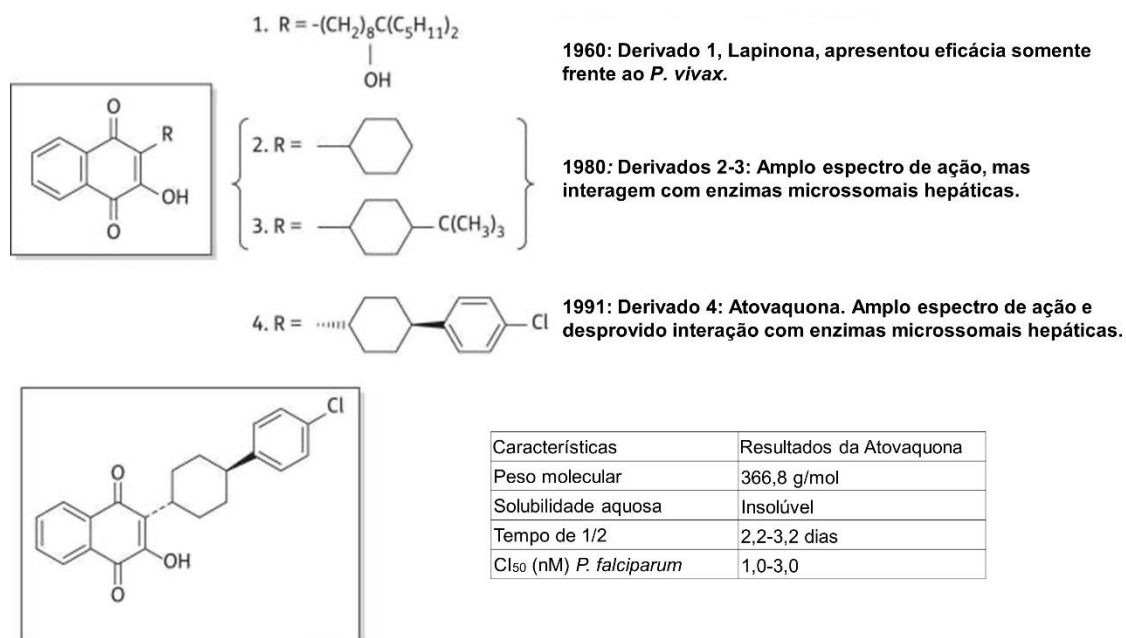


Figura 15. Evolução cronológica no desenvolvimento químico que culminou com a descoberta da Atovaquona. Tabela abaixo é um sumário das propriedades físico-químicas e terapêuticas da Atovaquona. Adaptado do trabalho de BAGGISH e HILL (2002).

Durante o planejamento estrutural dos derivados do lapachol e da atovaquona, o mecanismo de ação foi levado em consideração. Sabe-se que o principal alvo molecular da atovaquona é o sítio Q₀ do citocromo *bc1*, onde a Atovaquona estabelece ligações de hidrogênio com os aminoácidos His-181 e Glu-273 do citocromo *bc1*. O resíduo His-181 parece ser essencial para a interação do inibidor com o citocromo *bc1*, visto que o fármaco antimalárico experimental plasmodiona, no qual é potente em múltiplos estágios e eficaz *in vivo*, não exerce mecanismo antiparasitário por bloquear o complexo citocromo *bc1* pois a plasmodiona não possui hidroxila necessária para interagir com o resíduo His-181. (EHRHARDT et al., 2013). Já o lapachol não apresenta potente afinidade ao citocromo *bc1*. Diferentemente da Atovaquona, que apresenta ação antimalárica na escala de nanomolar, o lapachol não possui em sua estrutura uma cadeia lateral que permitam a interações hidrofóbicas com os resíduos Leu-275 e Ile-147 do citocromo *bc1* do plasmódio (Figura 16).

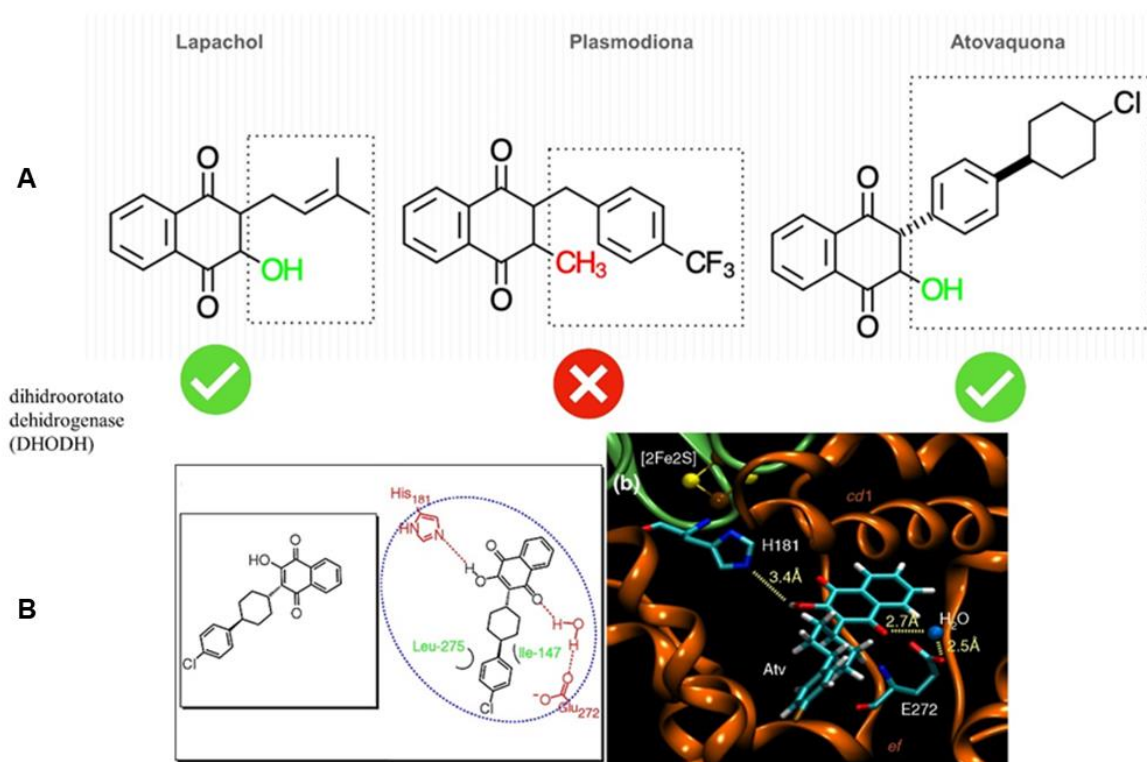


Figura 16: Estruturas químicas do Lapachol, Plasmodiona e Atovaquona e ligação da Atovaquona ao sítio de ação. Na região pontilhada as cadeias laterais as quais estes compostos se diferem e habilidade de cada composto em inibir a atividade enzimática da DHODH, no qual é indicativo que o composto inibe o citocromo *bc1* **(A)**. Modelagem molecular da atovaquona no sítio Q₀ do citocromo *bc1* **(B)**. Figura extraída de Kessl et al. (2004).

Tendo em mente estas semelhanças e diferenças entre a atovaquona e o lapachol, nós decidimos realizar um estudo comparativo de complexos metálicos de rutênio (III) contendo na sua composição a atovaquona ou o lapachol. Com este estudo comparativo, poderíamos investigar se o papel do complexo metálico é atuar como um sistema carreador de fármaco antimalárico, direcionando a naftoquinona para o interior das células do parasito. Isto poderia não somente desvendar o papel do complexo metálico, mas também ajudar a explicar se a potência baixa do lapachol como antimaláricos é devido a sua incorporação e acúmulo baixo nas células do plasmódio. De fato, na área oncológica, há evidências sólidas e consistentes que complexos metálicos contendo o lapachol podem atuar como um sistema de pró-fármacos, direcionando a entrega do lapachol nas células tumorais (KANDIOLLER et al., 2013; TABRIZI; CHINIFOROSHAN, 2017; GRANDIS et al., 2019; OLIVEIRA et al., 2020; OLIVEIRA et al., 2021;), denotando que esta estratégia poderia ser utilizada no tratamento da malária.

Do ponto de vista químico, tanto o lapachol como a atovaquona se ligam ao átomo de rutênio de maneira idênticas, através de uma bicoordenação de uma carbonila e uma hidroxila da quinona ao rutênio, formando uma espécie bicoordenada (isto é, bidentado) (GRANDIS et al., 2019). Esta espécie bicoordenada forma um anel de cinco-membros que é estável e, portanto, evita que a naftoquinona se dissocie do complexo metálico antes de interagir com as células-alvo de estudo. Com isso, neste trabalho, vislumbramos o estudo de uma série química de complexos metálicos de rutênio (III) contendo na sua composição a atovaquona ou o lapachol.

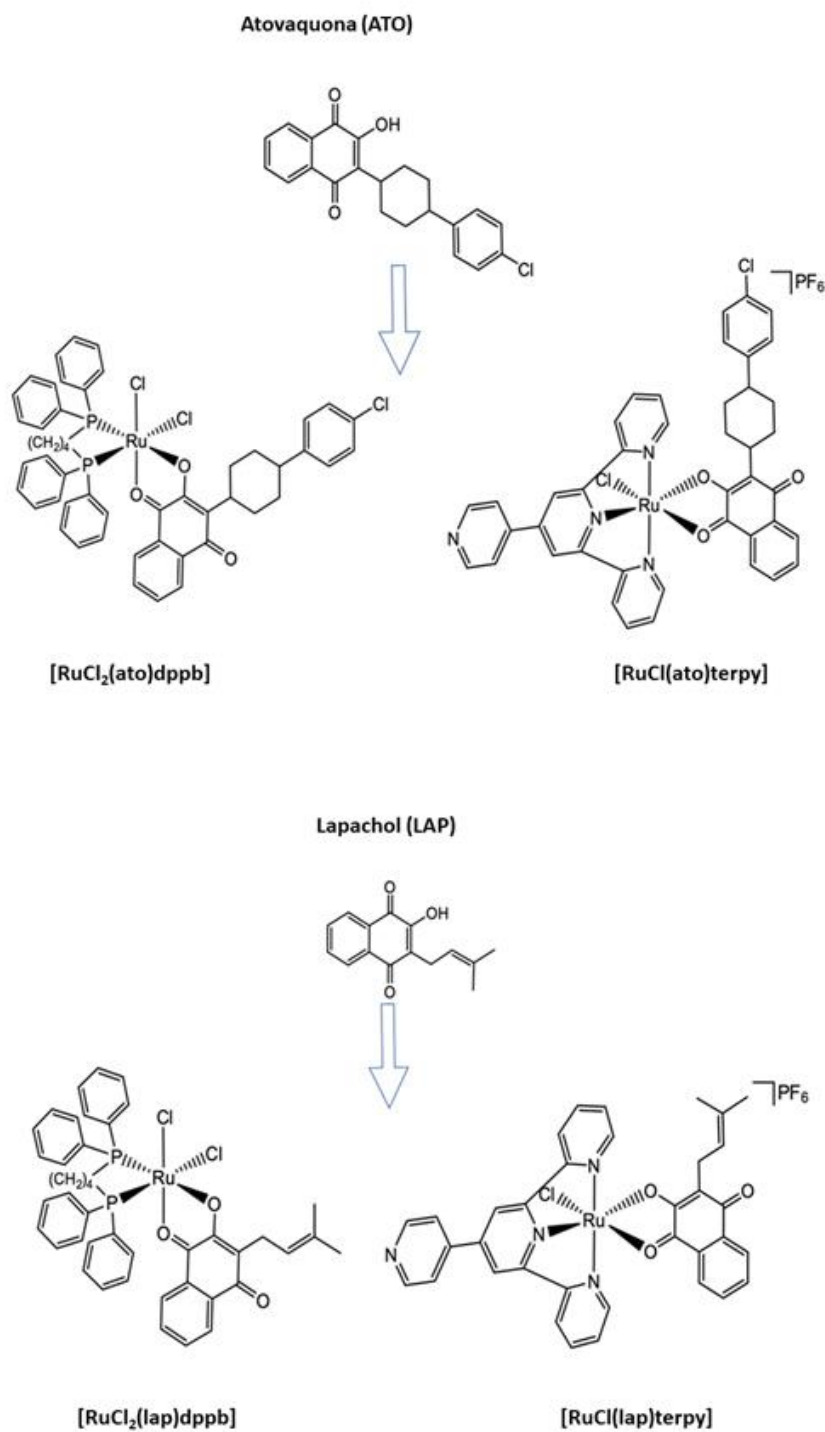


Figura 17: Estruturas químicas do lapachol (LAP), atovaquona (ATO) e dos complexos metálicos estudados. PF₆ = hexafluoreto de fósforo. [RuCl₂(ato)terpy] = Derivado 1, [RuCl₂(ato)dppb] = Derivado 2, [RuCl(lap)terpy] = Derivado 3, [RuCl₂(lap)dppb] = Derivado 4.

Além de variar o tipo de naftoquinona utilizada na composição química dos complexos metálicos, também variamos a utilização do outro componente químico, o co-ligante, de natureza fosfínica ou piridínica. O co-ligante é importante para completar a esfera de coordenação do átomo de rutênio e auxilia na estabilidade química (ALESSIO, 2016). Aqui, estudamos o co-ligante fosfínico 1,4-bis(difenilfosfina)butano (dppb), o qual se liga de maneira bidentada ao átomo de rutênio, o que resultou na série de derivados $[(RuCl_2(ato)(dppb)]$ (2) e $[(RuCl_2(Lap)(dppb)]$ (4) e também o ligante piridínico terpy denominado 4'-(4-piridil)-2,2':6,2''-terpiridina no qual resultou na série de derivados $[(RuCl(ato)(terpy)]$ (1) e $[(RuCl(lap)(terpy)]$ (3). Enquanto que o co-ligante dppb foi escolhido por se ligar bidentado ao rutênio e por ter sido o mesmo empregado anteriormente pelo nosso grupo de pesquisas em 2014, o ligante terpy foi escolhido por se ligar ao átomo de rutênio como um ligante tridentado, formando uma espécie com três pontos de coordenação ao átomo de rutênio. Estudos mostram que um co-ligante tridentado como a terpy é mais difícil de se dissociar do átomo metálico do que um ligante bidentado como o dppb ou a naftoquinona. Tendo em vista isto, durante a hidrólise no ambiente celular dos complexos metálicos com as naftoquinonas, seria esperado que a naftoquinona fosse dissociada do rutênio facilmente dos derivados 1 e 3 contendo terpy. Já nos derivados 2 e 4, contendo dois bidentados, a troca de ligantes poderia resultar em uma competição de qual ligante seria liberado primeiro, o dppb ou a naftoquinona.

Com base nisto, seria de se esperar que os derivados 1 e 3 atuariam como sistemas de liberação de fármaco menos rápido, enquanto que os derivados da 2 e 4 atuariam como sistemas de liberação de fármaco mais rápido. Considerando que o perfil distinto de liberação de um pró-fármaco pode alterar a farmacocinética e/ou a farmacodinâmica de uma substância biologicamente ativa, melhorando suas propriedades terapêuticas. A hipótese do planejamento experimental dos compostos químicos vislumbrou que complexos metálicos contendo naftoquinonas poderiam apresentar perfis distintos de liberação das naftoquinonas antimaláricas, podendo resultar em compostos antiparasitários potencialmente úteis ao tratamento da malária (Figura 17).

3 OBJETIVOS

3.1 GERAIS

Investigar atividade antiplasmodial de complexos metálicos rutênio-lapachol e rutênio-atovaquona.

3.2 ESPECÍFICOS

- ✓ Determinar a atividade antiparasitária *in vitro*, o perfil de citotoxicidade em células mamíferos e a seletividade dos compostos em formas assexuadas do *P. falciparum*;
- ✓ Investigar a habilidade dos compostos em se ligarem a glutatona reduzida e as consequências desta habilidade com possível mecanismo de ação;
- ✓ Avaliar a eficácia do tratamento dos compostos no modelo de malária experimental em camundongos infectados com o *P. berghei*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA

O Lapachol foi gentilmente fornecido pelo Laboratório Farmacêutico de Pernambuco (LAFEPE, Recife, Pernambuco). A Atovaquona e os demais reagentes químicos para a síntese dos complexos metálicos foram adquiridos pela Sigma-Aldrich. A síntese dos complexos metálicos de rutênio (III) com as naftoquinonas lapachol ou Atovaquona foi realizado seguindo a metodologia descrita por Barbosa et al. (2014). A caracterização química e a determinação da pureza (95%) foram determinadas por UV-vis, condutância molar, infra-vermelho e a análise elementar de todos os complexos, enquanto que a cristalografia por difração de raios-X foi determinada para o complexo $[(RuCl_2(ato)(dppb)]$ (Figura 18). A compilação e discussão dos dados químicos serão apresentados futuramente na tese de doutorado da Júlia Scaff Moreira Dias do Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Alfenas.

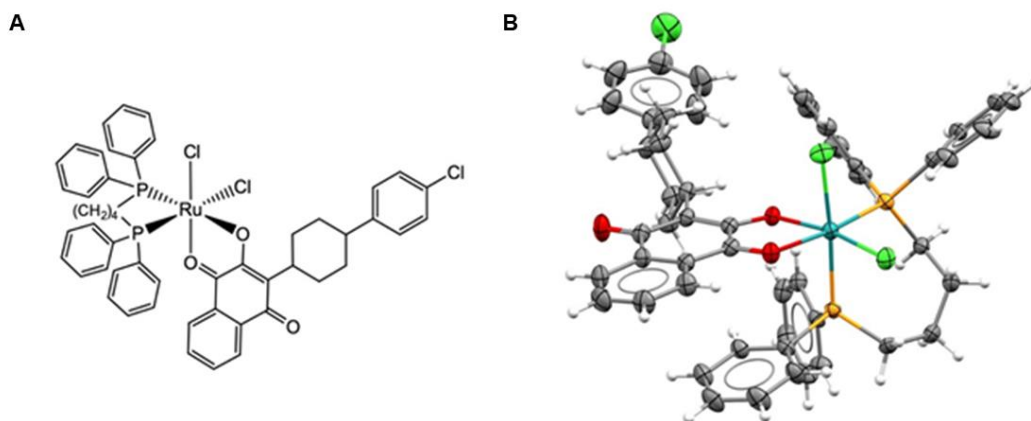


Figura 18: Caracterização química do complexo $[(RuCl_2(ato)(dppb)]$. Estrutura química do complexo $[(RuCl_2(ato)(dppb)]$ (A). Estrutura química do complexo $[(RuCl_2(ato)(dppb)]$ determinada por cristalografia de raios-X (B).

4.2 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE

A atividade citotóxica dos derivados e lapachol foi avaliada utilizando macrófagos da linhagem J774 e células de hepatocarcinoma humano (HepG2). Doxorrubicina foi utilizada como controle positivo nos ensaios de citotoxicidade. Células J774 ou HEPG2 e drogas foram incubadas em placas de 96 poços (1×10^4 células/poço) em meio DMEM e RPMI 1640 (Life Technologies, GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD), respectivamente, suplementado com 10% de soro bovino fetal (v/v) (Invitrogen, Life Technologies, GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD) e 50 $\mu\text{g/mL}$ de gentamicina (Invitrogen, Life Technologies, GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD), e mantido por 24 horas em estufa a 37°C e 5% de CO_2 . Os compostos foram testados em seis concentrações diferentes (80 μM , 40 μM , 20 μM , 10 μM , 5 μM , 2,5 μM), em triplicatas, durante 72 horas. A avaliação da viabilidade celular foi feita por luminescência utilizando o kit CellTiter-Glo® (Promega Corporation, Madison, WI, USA), o qual avalia a viabilidade celular por meio da presença de ATP, a qual se liga a luciferina, formando o complexo oxiluciferina e resulta em luminescência (Figura 19). A leitura foi realizada com pelo leitor de placas (Filtermax F3 & Filtermax F5, Molecular Devices) seguindo instruções do fabricante do kit. Os valores da concentração citotóxica de 50% (CC_{50}) foram calculados utilizando leituras obtidas em três experimentos independentes.

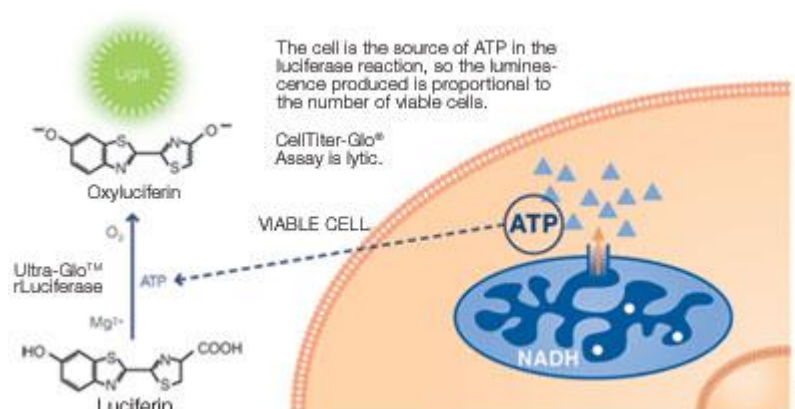


Figura 19: Esquema representativo da metodologia de viabilidade celular. Esquema representativo pelo CellTiter-Glo®. Figura extraída das instruções do fabricante.

4.3 CRESCIMENTO PARASITÁRIO DE CEPAS DO *P. FALCIPARUM*

As cepas de *P. falciparum* sensíveis à cloroquina (D10 e 3D7) e resistente à cloroquina (W2) foram mantidas em frascos de cultura de células de 25 cm². As cepas D10 e W2 foram cultivadas em 5% (v/v) de hematócrito (hemáticas humanas tipo A positivo) em meio RPMI-1640 (EuroClone, Celbio) contendo 8 mg/mL de AlbuMax (Invitrogen, Milan, Italy), 0,1 mg/mL de hipoxantina, 25 mM de HEPES e 2 mM de L-glutamina. As culturas foram mantidas a 37°C em uma mistura de gás de 1% de O₂, 5% de CO₂ e 94% de N₂.

A cepa 3D7 foi cultivada em 5% (v/v) de hematócrito (hemácias humanas do tipo O positivo) em meio RPMI-1640 (EuroClone, Celbio) contendo 5% (v/v) de plasma humano O positivo, 0,37 mM de hipoxantina, 25 mM de HEPES e 2 mM de L-glutamina. A cultura foi mantida nas mesmas condições mencionadas acima.

4.3.1 AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIPLASMODIAL *IN VITRO* FRENTE À CEPAS DO *P. FALCIPARUM*

Os derivados e lapachol foram dissolvidos em DMSO e depois diluídos com meio RPMI para alcançar as concentrações desejadas (concentração final de DMSO <1%, a qual não é tóxica para o parasito). A cloroquina foi utilizada como controle positivo e a Atovaquona como droga referência e controle positivo nesse ensaio.

Os compostos foram plaqueados em placas de 96 poços de fundo chato e diluições seriadas foram realizadas. Em seguida, culturas assíncronas (parasitemia de 1-1,5%; 1% de hematócrito final) foram alíquotadas nas placas e incubadas por 72 horas à 37°C. Após o tempo de incubação, o crescimento do parasito foi determinado através da mensuração da atividade da enzima desidrogenase lactato do parasito (pLDH) por espectrofotometria.

A cultura tratada com os compostos foi ressuspensa e 20 µL/poço foram transferidos para uma nova placa de fundo chato contendo 100 µL do reagente MALSTAT (0,11% v/v Triton-100X, 115,7 mM de Lítio L-lactato, 30,27 mM de Tris, 0,62 mM de dinucleotídeo 3-acetilpiridina adenina (3-acetylpyridine adenine dinucleotide - APAD) (Sigma-Aldrich), ajustado para pH 9 com 1 M de HCl) e 25 µL de PES/NBT (1,96 mM de azul de nitrotretazólio e 0,24 mM de etosulfato fenazina).

A placa foi incubada no escuro à temperatura ambiente (20°C) por 15 minutos e depois lida no comprimento de onda de 650 nm usando um leitor de microplaca Synergy4 (BioTek). Os resultados foram analisados e expressos como a concentração inibitória de 50% em relação aos poços (IC₅₀). Três experimentos independentes foram realizados.

4.4 ENSAIO DE HEMÓLISE

Eritrócitos humanos O+ frescos de doador saudável e não infectados foram centrifugados três vezes com tampão fosfato-salino (PBS), ajustados para 1% de hematócrito e 100 µL foram distribuídos em uma placa de fundo redondo de 96 poços. Então, 100 µL dos compostos previamente solubilizados em DMSO (Sigma-Aldrich) e suspensos em PBS 1x foram dispensados nos respectivos poços. Cada composto foi testado em sete concentrações (50-0,78 µM), em triplicata. Hemácias não tratadas receberam 100 µL de PBS 1x contendo 0,5% de DMSO (controle negativo), enquanto para o controle positivo foi utilizada saponina (Sigma-Aldrich) a 1% v/v. As placas foram incubadas por 1 hora a 37°C sob 5% de CO₂ e então centrifugadas a 1500 rpm por 10 min. O volume de 100 µL do sobrenadante foi transferido para uma segunda placa, a qual foi lida em espectrofotômetro SpectraMax 190 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) no comprimento de onda de 540 nm, conforme descrito em Wang et al. (2010). A porcentagem de hemólise foi calculada em comparação com os controles positivos e negativos, usando GraphPad Prisma 5.01.

4.5 ENSAIO DE LIGAÇÃO COM A GLUTATIONA REDUZIDA

Para investigar um dos possíveis mecanismos de ação, os compostos foram ensaiados para avaliar se interagem covalentemente com a glutatona reduzida (GSH). As drogas foram diluídas em três concentrações diferentes (4 mM, 1 mM, 0,25 mM) em tampão fosfato-salino (PBS) 1x pH 8. Como controle positivo utilizamos composto de Ouro (I) (AuClP(Ph)₃), no qual é um análogo do Auranofino e de reconhecida capacidade de se ligar ao GSH (PEREIRA et al., 2020; KAZIMI et al.,

2019).

Posteriormente, as amostras (20 μ L) foram expostas à solução de GSH 0,25 mM (100 μ L) e incubadas por 24 horas à 37°C. Após esse período, 100 μ L das amostras foram transferidas para placa de 96 poços de fundo opaco preto e adicionada solução contendo o corante monochlorobimane (Sigma-Aldrich) à 1 mM. As amostras foram incubadas à 37°C e após 15 minutos e 1 hora foram realizadas as leituras por fluorescência (Excitação 360 nm e emissão 460 nm), seguindo metodologia adaptada de Dean et. al (2017) e Imai et. al (2017). Os resultados são provenientes de 2 ensaios independentes.

4.6 ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA *IN VIVO*

Para avaliar atividade antiplasmodial *in vivo* dos Derivados 1 e 2, foi adotada a metodologia de Peters (PETERS et al., 1975) em dois experimentos independentes. O uso de animais foi aprovado pela Comissão de Ética do Uso no Animais (CEUA), número de protocolo 20/2018. Camundongos Swiss Webster, machos com peso entre 15 – 20 gramas, (n=5/grupo) foram infectados com *P. berghei* da cepa GFP (2×10^7 de células infectadas) por via intraperitoneal. Após 24 horas da infecção, foi iniciado o tratamento com 100 μ L de Atovaquona à 1,7 mg/kg (4,6 μ mol/kg), Derivado 1 à 15 mg/kg (15,6 μ mol/kg) ou solução veículo contendo proprilenoglicol/solução salina 0,9% (30:70, v/v) por via subcutânea durante quatro dias consecutivos. A parasitemia foi monitorada por citometria de fluxo nos dias 5, 8, 10 e 12 após infecção. A sobrevivência dos animais foi acompanhada durante 30 dias. Da mesma forma, o Derivado 2 foi testado na dose de 15 mg/kg (15,6 μ mol/kg) e 5 mg/kg (13,7 μ mol/kg) para atovaquona. A parasitemia foi observada nos dias 5, 7, 10 e 14 e a sobrevivência acompanhada por 30 dias.

Para a avaliação da parasitemia dos animais infectados, foram coletados 10 μ L de sangue da cauda de cada camundongo em tubos contendo 100 μ L de heparina (Hemofol). As amostras foram centrifugadas por 5 minutos à 1500 rpm, foi retirado o sobrenadante contendo heparina, centrifugados com solução salina (0,9%). Logo após, o sobrenadante foi retirado e adicionado às amostras uma solução de Mitotracker™ Deep Red FM (67 nM) (Life Technology, Carlsbad, CA) e

armazenada à 37°C por 20 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas, os pellets coletados e centrifugados novamente para retirada de resíduos do reagente. As amostras foram analisadas no citômetro BD LSRFortessa através da leitura de 250.000 eventos no canal do isotiocianato (FITC) (green laser – 400 – 530 nm) e alofocianina (APC) (Red Laser – 640 nm).

4.7 PROPOSTA DE ANÁLISE

Os valores obtidos dos experimentos foram provenientes da média \pm desvio padrão da média. A significância das diferenças nos resultados foi estimada pelo teste de ANOVA – ONE WAY. Os valores de CC_{50} dos compostos foram provenientes da média de três ensaios independentes. Todos os dados foram analisados utilizando o GraphPad Prisma (GraphPad Software, Intuitive Software for Science, San Diego, CA).

5 RESULTADOS

5.1 COMPLEXOS METÁLICOS NÃO SÃO CITOTÓXICOS E POSSUEM ATIVIDADE ANTIPLASMODIAL *IN VITRO*

Inicialmente, os compostos foram ensaiados em cepas de *Plasmodium falciparum* sensíveis (3d7 e D10) e resistente à cloroquina (W2). Os valores da concentração inibitória para 50% (CI₅₀) de crescimento do parasito foram obtidos a partir da mensuração da atividade da enzima desidrogenase lactato do parasito (pLDH), seguindo metodologia descrita por Makler e Hinrichs (1993). Todos os valores de CI₅₀ estão sumarizados nas Tabelas 2 e 3.

O Derivado 1 apresentou melhor atividade antiplasmodial dentre os derivados baseados na atovaquona, apresentando potência superior à cloroquina. Por outro lado, o Derivado 2 foi inativo em todas as cepas de plasmódio testadas. Na cepa resistente a cloroquina (W2) o Derivado 1 apresentou melhor potência, em comparação ao Derivado 2 e a cloroquina, com valor de IC₅₀ cerca de 11 vezes mais potente que a cloroquina. Nas cepas sensíveis a cloroquina, o Derivado 1 apresentou valor equipotente a cloroquina na cepa 3d7 e foi cerca de 1,8 vezes mais potente na cepa D10. Quando comparado a atovaquona, o Derivado 1 foi menos potente, com CI₅₀ de 12, 22 e 40 vezes menos ativo para as cepas 3d7, D10 e W2, respectivamente.

Dentre os compostos derivados do lapachol, o Derivado 3 foi o que apresentou melhor atividade diante das três cepas de plasmódio, sendo mais potente na cepa 3d7 com CI₅₀ de $4,11 \pm 2 \mu\text{M}$. Nas cepas D10 e W2, o Derivado 3 também exibiu atividade antiplasmodial significativa, sendo 3 e 7 vezes mais potente que o lapachol. Por outro lado, em comparação com o Derivado 3, o Derivado 4 foi menos ativo na cepa 3d7, e cerca de 2 vezes mais potente na cepa D10 e 1,5 vezes na cepa W2. Ambos Derivado 3 e 4 apresentaram melhor atividade antiplasmodial *in vitro* do que o lapachol. Entretanto, nenhum dos compostos baseados no lapachol foi tão potente quanto o Derivado 1 e a Atovaquona.

Para avaliar a citotoxicidade, os compostos foram testados em ensaios de

viabilidade celular em células de linhagem de hepatocarcinoma humano (HepG2) e macrófagos murinos (J774). Ambas linhagens foram utilizadas tanto para avaliar se os derivados eram tóxicos em células de mamíferos, quanto se a toxicidade se estende às células humanas. Os valores obtidos foram referentes a três ensaios, dos quais obteve-se a média de citotoxicidade de 50% (CC₅₀) dos compostos.

Ambos derivados baseados na atovaquona foram menos tóxicos que o fármaco atovaquona. O Derivado 2 não foi citotóxico em nenhuma das concentrações testadas nas duas linhagens celulares. Enquanto o Derivado 1 apresentou CC₅₀ de 80000 nM (80 µM) e 30000 nM (30 µM) para HepG2 e J774, respectivamente. Tanto o Derivado 1 quanto o Derivado 2 foram menos citotóxicos na linhagem HepG2 do que os fármacos referência. Ao mesmo tempo que em macrófagos J774 foi observado essa característica apenas no Derivado 2 (Tabela 2). Nenhum dos derivados foi tão citotóxico quanto o controle positivo, a doxorrubicina.

Os compostos-teste apresentaram valores de CC₅₀ acima da faixa necessária para inibição de 50% dos parasitos *in vitro*. Diante disso, o índice de seletividade (IS) pôde ser calculado a partir da diferença entre CC₅₀ e IC₅₀, avaliando a seletividade dos derivados entre células de mamíferos (HepG2 e J774) e o parasito (cepa 3d7). Então, quanto maior o índice de seletividade, mais seletiva é a droga. O Derivado 1 foi mais seletivo que a cloroquina quando avaliado para célula de linhagem humana (HepG2), com índice de 6666 (Tabela 1). O Derivado 2 não foi possível calcular o IS. Nenhum dos derivados foi tão seletivo e potente quanto a atovaquona. Porém, é possível observar que o Derivado 1 possui potente atividade contra o plasmódio e não foi tóxico para células de mamíferos.

Tabela 2: Atividade citostática frente ao estágio sanguíneo do *Plasmodium falciparum* (cepas 3d7, D10 e W2), citotoxicidade em células de mamíferos (J774 e HepG2) e índice de seletividade dos Derivados 1 e 2.

Compostos	<i>P. falciparum</i> , $CI_{50} \pm D.P.$ [nM]			Citotoxicidade ($CC_{50} \pm D.P.$)		I.S. (HepG2)	I.S. (J774)
	3d7 sensível	D10 sensível	W2 resistente	HepG2	J774		
	Atovaquona	1,4 ± 0,1	0,58 ± 0,1	1,36 ± 0,6	27800 ± 800	29600 ± 3300	19142
Derivado (1)	12 ± 0,7	13 ± 5,0	41,0 ± 19,0	80000 [#]	30000 [#]	6666	2500
Derivado (2)	>500	>500	>500	>80000	>80000	N.D.	N.D.
Cloroquina	16 ± 1,8	23 ± 3,2	470 ± 7,9	37600 ± 3600 ^R	76100 ± 3100 ^R	2350	4756

Derivado (1) = [RuCl(ato)(terpy)]PF₆; Derivado (2) = [Ru(ato)dppb]. D.P. = Desvio Padrão da média. N.D.= Não determinado. # = CC₅₀ obtidos a partir de valores estimados após realização de três experimentos independentes. I.S. = Índice de Seletividade. I.S. calculado a partir da razão entre CC₅₀ e IC₅₀. I.S. calculado a partir do CI₅₀ de cepa 3d7; ^R = Valor de referência retirado do artigo MACEDO, et. al. 2016.

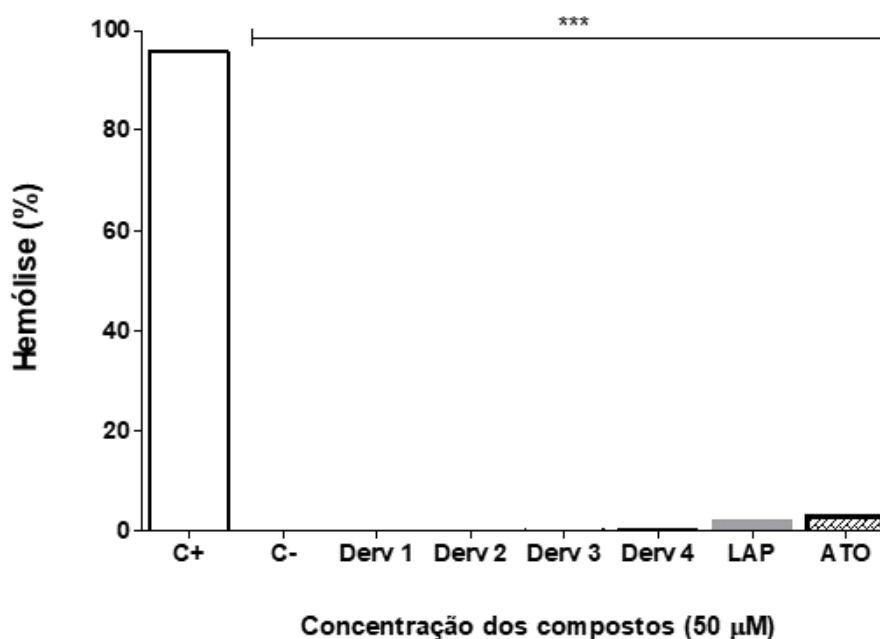
Tabela 3: Atividade citostática frente ao estágio sanguíneo do *Plasmodium falciparum* (cepas 3d7, D10 e W2), citotoxicidade em células de mamíferos (J774 e HepG2) e índice de seletividade do lapachol, Derivado 3 e Derivado 4.

Compostos	<i>P. falciparum</i> , $CI_{50} \pm D.P.$ [μM]			Citotoxicidade ($CC_{50} \pm D.P.$)		I.S. (HepG2)	I.S. (J774)
	3D7 sensível	D10 sensível	W2 resistente	HepG2	J774		
	Lapachol	8,73 \pm 0,5	44,16 \pm 7,9	45,05 \pm 16,4	>80	>80	N.D.
Derivado (3)	4,11 \pm 2	9,2 \pm 6,8	5,75 \pm 3,1	30,2 \pm 20,2	58,0 \pm 7,7	7	14
Derivado (4)	9,18 \pm 4,5	5,21 \pm 3,31	3,5 \pm 2,4	>80	N.D.	N.D.	N.D.
Cloroquina	0,016 \pm 0,002	0.0233 \pm 0.0032	0.470 \pm 0,08	37,6 \pm 3,6 ^R	76,1 \pm 3,1 ^R	2350	4756

Derivado (3) = [RuCl(lap)(terpy)]. Derivado (4) = [RuCl₂(lap)dppb]. D.P. = Desvio Padrão da média. N.D.= Não determinado. I.S. = Índice de Seletividade. I.S. calculado a partir da razão entre CC_{50} e IC_{50} . ^R = Valor de referência retirado do artigo MACEDO, et. al. 2017. ^R = Valor de referência retirado do artigo MACEDO, et. al. 2016.

5.2 COMPLEXOS METÁLICOS COM ATOVAQUONA NÃO INDUZEM HEMÓLISE E SE LIGAM A GLUTATIONA REDUZIDA

Para avaliar se os compostos possuíam capacidade hemolítica, foi realizado ensaio de hemólise em eritrócitos não infectados. Como controle positivo a saponina 1% foi utilizada. Os Derivados não induziram hemólise até a concentração de 50 μM (Figura 20 A e B). Apenas o lapachol foi hemolítico, apresentando aproximadamente 2% de hemólise na maior concentração testada (50 μM). Esses achados indicam que a atividade antiparasitária dos compostos é seletiva para o parasito, pois, ao agirem no parasito, não causam danos aos eritrócitos.

A

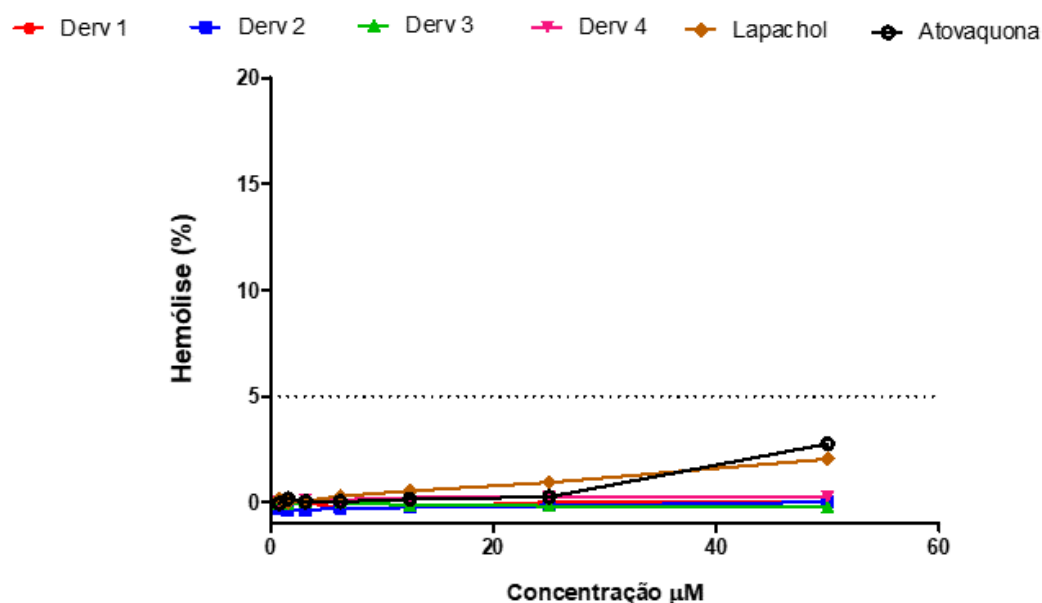
B

Figura 20: Avaliação de potencial hemolítico de compostos-teste. (A) Percentual de hemólise em eritrócitos não infectados e tratados com os complexos rutênio/atovaquona, rutênio/lapachol e lapachol (concentração de 50 µM) por 1 hora. Os valores representam média±D.P. de três replicatas. One-Way ANOVA. *** $p < 0.05$ em comparação com o controle positivo **(B)** Curva concentração-resposta com percentual de hemólise de eritrócitos não-infectados tratados com os derivados durante 1 hora.

O sistema glutathiona é um importante mecanismo antioxidante e de sobrevivência do plasmódio. Este sistema compreende NADPH como doador de elétrons, a glutathiona redutase do parasito (PfGR) altamente ativo (localizado no citosol e apicoplasto) e glutathiona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), que tem como função principal a detoxificação de espécies reativas de oxigênio (ROS) resultantes do processo de digestão da hemoglobina (KASOZI et al., 2013). Com o objetivo de investigar se esse seria um dos possíveis mecanismos de ação, os compostos foram avaliados quanto a ligação à glutathiona reduzida (GSH). Baseado nos resultados anteriores, os Derivados 1 e 2 foram selecionados para dar continuidade aos testes. Os compostos foram diluídos em três concentrações diferentes (4 mM, 1 mM e 0,25 mM) e expostos a solução contendo 0,25 mM de GSH. Entre ambos compostos, o Derivado 1 apresentou percentual de ligação com GSH semelhante ao controle positivo, de forma concentração-dependente, com inibição próximo à 80% na maior concentração testada (Figura 21B). Por possuir na estrutura química tanto a

Atovaquona, quanto o precursor, ambos foram testados. De forma semelhante ao Derivado 1, o precursor apresentou inibição total do GSH na maior concentração. Diferentemente da Atovaquona, a qual não apresentou esse perfil. Tais achados dão indícios que o precursor contendo o rutênio possui importante papel na inibição do GSH no parasito, podendo agir sinergicamente com a Atovaquona presente na molécula no parasito.

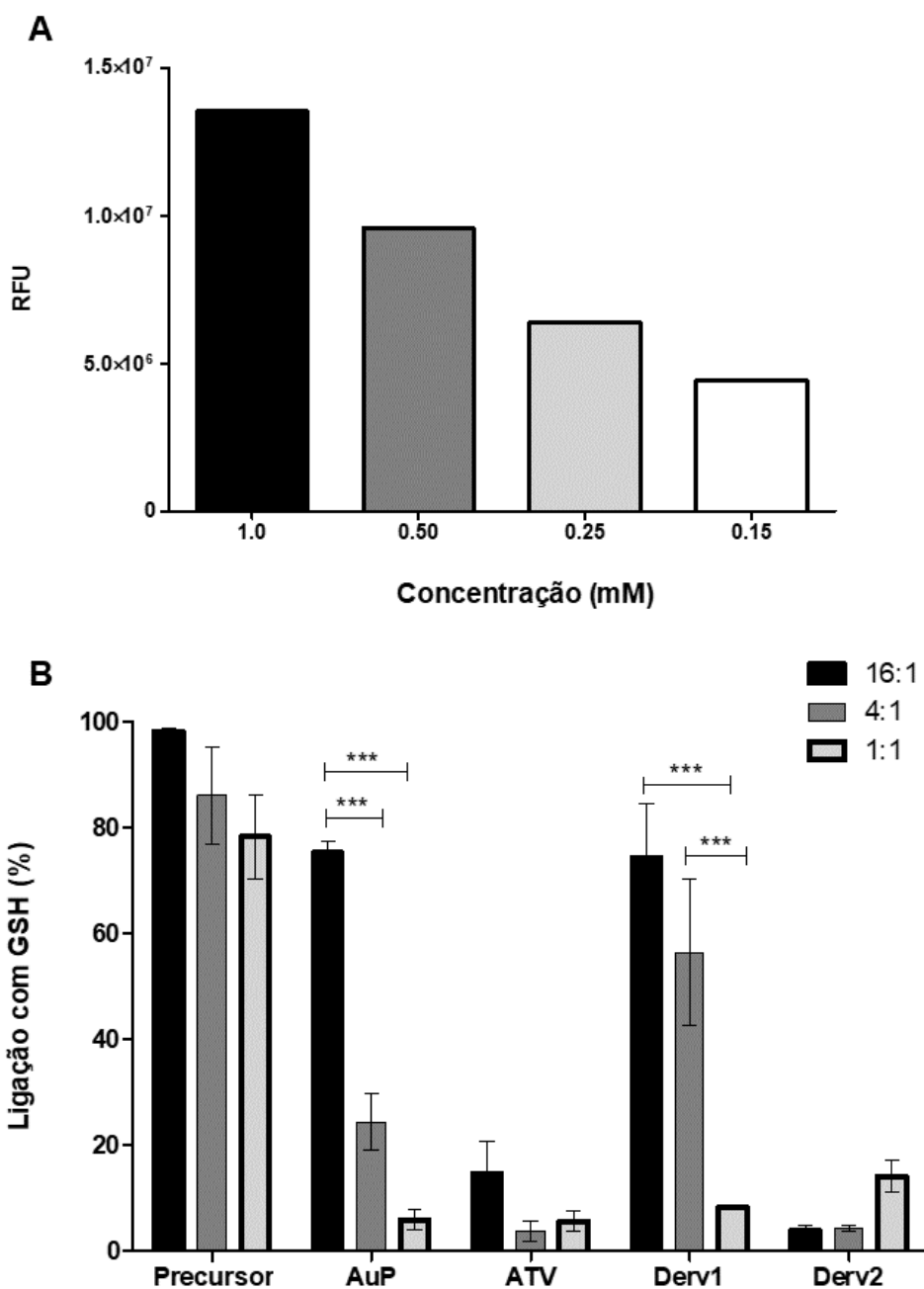


Figura 21: Avaliação de ligação com glutatona reduzida. Curva-padrão de diferentes concentrações da GSH na presença do corante monochlorobimane à 1 mM (A). Percentual de ligação de GSH com derivados nas proporções 16:1, 4:1, 1:1 (composto versus GSH) determinado por fluorescência (B). Os valores são referentes a Média±S.E.M. Two-Way ANOVA (pós-teste de Bonferroni) ***p<0,001. Derv1 = Derivado 1. Derv2 = Derivado 2. ATV= Atovaquona. Precursor = [Ru(Cl)₃H₂O(dppb)]. AuP = AuCIP(Ph)₃. GSH = Glutatona Reduzida. RFU = unidade de fluorescência relativa.

5.3 AVALIAÇÃO *IN VIVO* DE ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA

Baseado nos resultados de obtidos *in vitro*, os Derivados 1 e 2 foram avaliados *in vivo*. Para isso, foi analisada a capacidade supressora de parasitemia contra *P. berghei*-GFP e consequente sobrevivência dos animais, segundo metodologia de Peters. Tal metodologia tem como finalidade avaliar performance do fármaco teste frente ao *Plasmodium spp.* *in vivo* após 4 dias consecutivos de tratamento (PETERS et al., 1975). O *P. berghei*-GFP, cepa que expressa a proteína de fluorescência verde, foi utilizado no estudo por ser uma cepa que é facilmente detectável em seus estágios sanguíneos pela fluorescência que expressa, podendo ser avaliada por citometria de fluxo, sem a necessidade de marcação com reagentes radioativos (SANCHEZ, 2007).

Inicialmente, o Derivado 1 foi administrado por via subcutânea durante quatro dias consecutivos na dose de 15 mg/kg (15,6 µmol/kg), sendo a primeira dose administrada após 24 horas de infecção. A parasitemia foi avaliada nos dias 5, 8, 10, 12 e 20 por citometria de fluxo e sobrevivência acompanhada por 30 dias. O grupo veículo apresentou aumento da parasitemia ao longo dos dias, enquanto o Derivado 1 diminuiu a parasitemia dos animais semelhante à atovaquona (dose de 4,6 µmol/kg) (Figura 22D). Consequentemente, foi observado nos 30 dias de ensaio que o Derivado 1 aumentou o tempo de sobrevivência dos animais, o qual mostrou diferença significativa em comparação com o grupo não-tratado (veículo) (Figura 22E).

Ao tabular os valores de parasitemia dos animais, foi observado que o Derivado 1 diminuiu o percentual em 63% após 5 dias de infecção, e manteve tais taxas até o dia 10. Após 20 dias do início do experimento, observamos que o Derivado 1 conseguiu suprimir 77% da parasitemia nos camundongos tratados com esse composto (Tabela 4). Além disso, o Derivado 1 aumentou a mediana de

sobrevivência desses animais, quando comparado ao grupo veículo, e foi eficaz na supressão da parasitemia que, por consequência, influenciou na taxa de sobrevivência dos animais em 60%.

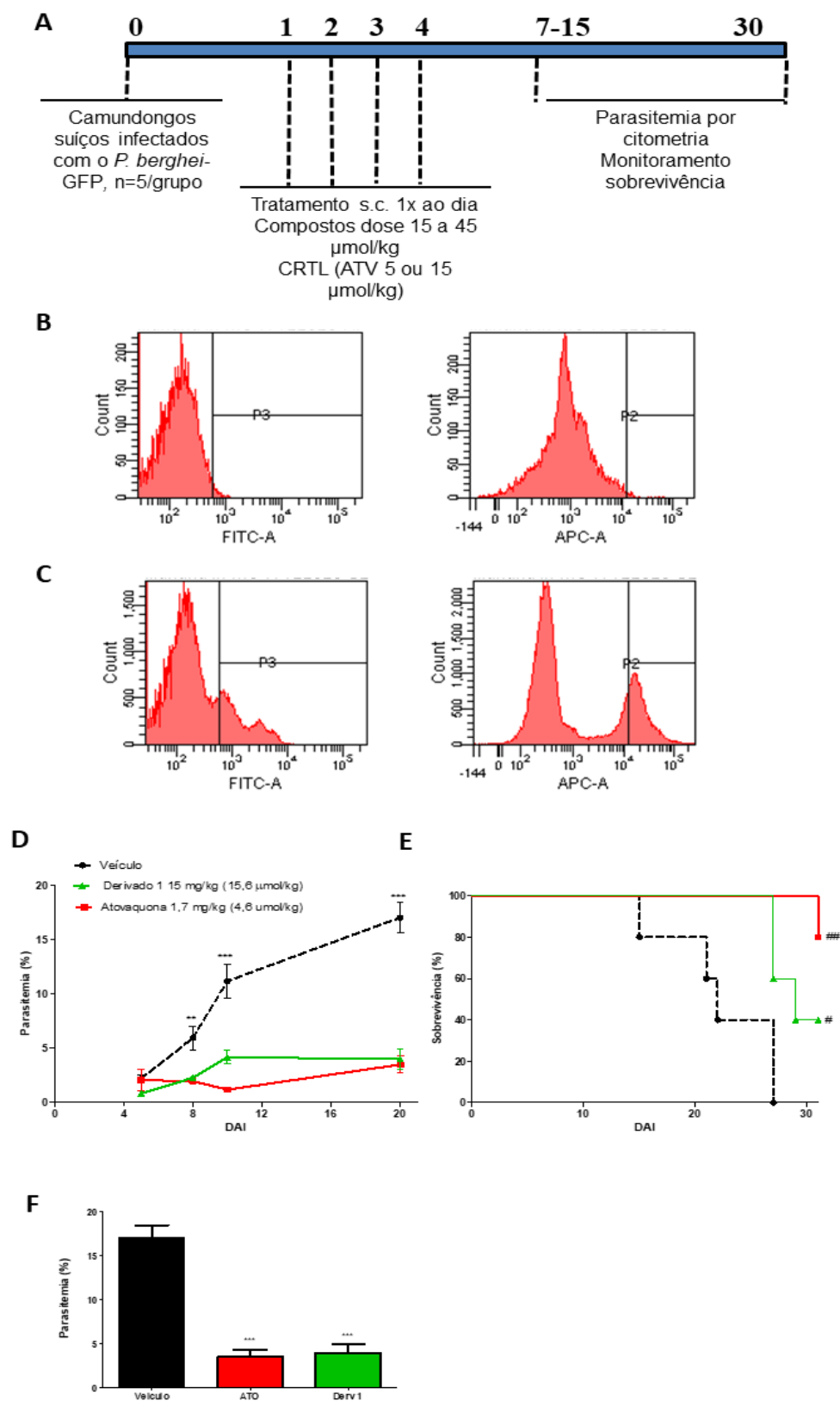


Figura 22: Avaliação da eficácia do Derivado 1 em camundongos infectados. Esquema do desenho experimental do protocolo de Peters de supressão da malária em roedores (A). Histogramas representativos determinado por citometria de fluxo do sangue de camundongo não-infectado e marcado com corante Mitotracker deep red FM (B). Histogramas determinado por citometria de fluxo do sangue de camundongo infectado (grupo salina) e marcado com corante Mitotracker deep red FM (C). Percentual de parasitemia do Derivado 1 (D) e taxas de sobrevivência dos animais (E). Percentual de parasitemia do dia 10 após infecção (F). Camundongos Swiss Webster (n=5) foram infectados com cepa *P. berghei*-GFP e tratados por 4 dias consecutivos (via subcutânea). Nos painéis (B) e (C), P3 é a população marcada com GFP (GFP+), enquanto que P2 é a população marcado com corante de viabilidade da mitocôndria. ***p<0,005, **p<0,05 em comparação com o grupo veículo One-Way ANOVA e pós-teste de Turkey. ##p<0,005 (Veículo versus Atovaquona) e #p<0,05 (Veículo versus derivado 1) Log-rank (Mantel-Cox). Valores referentes à média \pm E.P.M. dos dias 5, 8, 10 e 20. DAI = Dias após infecção.

Tabela 4: Percentual de redução da parasitemia, mediana e taxa de sobrevivência de Derivado 1

Compostos	Dose (μ mol/kg)	% Redução de parasitemia ^a			Mediana de sobrevivência (dias)	% Sobrevivência
		D5	D10	D20		
Veículo	-	0	0	0	22	0
Atovaquona	4,6	52 \pm 0,2	90 \pm 0,1	80 \pm 1,6	>30	80
Derivado 1	15,6	63 \pm 0,2	63 \pm 1,2	77 \pm 2,0	29	60

^a Valores referentes aos dias 5 (D5), 10 (D10) e 20 (D20) após infecção em comparação ao grupo veículo.

Diante dos resultados *in vitro* de citotoxicidade, também avaliamos a eficácia do Derivado 2 *in vivo* contra cepa *P. berghei*-GFP. Nosso objetivo foi investigar se o composto possuía características de pró-droga, o qual necessita do metabolismo do hospedeiro para ser ativo. Para isso, o composto foi testado adotando a metodologia de Peters (PETERS et al., 1975). As drogas foram administradas durante quatro dias consecutivos por via subcutânea nas doses de 15 mg/kg (15,6 µmol/kg) e 45 mg/kg (46,7 µmol/kg) para o Derivado 2 e 5 mg/kg (13,7 µmol/kg) para atovaquona. A parasitemia observada nos dias 5, 7, 10 e 14 e a sobrevivência acompanhada por 30 dias.

Durante o curso da infecção, observamos que o Derivado 2 diminuiu de forma significativa a parasitemia em comparação com o grupo veículo na dose de 46,7 µmol/kg a partir do dia 7 (Tabela 5). Porém, o Derivado 2 não foi tão eficaz em suprimir a parasitemia quanto ao observado com a atovaquona ou o Derivado 1 (Tabela 4). Em relação à sobrevivência dos animais, o Derivado 2 foi capaz de aumentar a mediana de sobrevivência, em comparação ao grupo veículo. Mesmo não sendo eficaz na supressão da parasitemia, o Derivado 2 manteve a taxa de sobrevivência acima de 50%.

Tabela 5: Percentual de redução da parasitemia, mediana e taxa de sobrevivência do Derivado 2

Compostos	Dose ($\mu\text{mol/kg}$)	% Redução de parasitemia ^a			Mediana de sobrevivência (dias)	% Sobrevivência
		D5	D7	D14		
Veículo	-	0	0	0	23	0
Atovaquona	13,7	56 \pm 0,04	81 \pm 0,1	96 \pm 0,1	>30	100
Derivado 2	15,6	0	0	0	22	0
Derivado 2	46,7	0	33 \pm 0,3	39 \pm 1	31	60

^a Valores referentes aos dias 5 (D5), 7 (D7) e 14 (D14) após infecção em comparação ao grupo veículo.

Após tabular os dados de eficácia e taxa de sobrevivência dos derivados na Tabelas 4 e 5, podemos observar que na mesma dose (15,6 $\mu\text{mol/kg}$) e via de administração (s.c.) o Derivado 1 exibiu perfil antimalárico *in vivo* melhor do que o Derivado 2, o qual foi eficaz na supressão da parasitemia dos animais e, como consequência, aumentou a mediana do tempo de vida. De fato, a eficácia do Derivado 2 é comparável ao do Derivado 1 somente quando o Derivado 2 é usado numa dose três vezes maior (46,7 $\mu\text{mol/kg}$); em outras palavras, o Derivado 1 é cerca de três vezes mais eficaz do que o Derivado 2 na malária experimental. Ainda de acordo com os dados da Tabelas 4 e 5, podemos estimar, ao analisar a taxa de sobrevivência quando os compostos foram testados na mesma faixa de dose (15,6 $\mu\text{mol/kg}$), que o Derivado 1 é cerca de três vezes menos eficaz que a atovaquona. Embora o Derivado 1 seja menos eficaz que a atovaquona, esse composto possui uma eficácia elevada dentre os antimaláricos usados na malária experimental, como podemos observar a sua eficácia superior ao se comparar com a cloroquina (PEREIRA et al., 2020).

6 DISCUSSÃO

Este trabalho demonstrou o potencial antimalárico de complexos metálicos rutênio-atovaquona e rutênio-lapachol frente ao estágio sanguíneo do plasmódio e possíveis mecanismos de ação.

A alta taxa de prevalência de casos de malária foi e continua sendo um grande problema de saúde pública. Somado a isso, na última década foi observado o surgimento de cepas de *Plasmodium falciparum* resistentes aos fármacos antimaláricos atualmente utilizados nos tratamentos. Mesmo havendo uma variedade de medicamentos antimaláricos, é sabido que o aumento de casos de parasitos resistentes necessita de estratégias terapêuticas eficazes que atuem em várias formas evolutivas do parasito e contornem os mecanismos de resistência. Estudos sobre a utilização de metais de transição vêm ganhando espaço na área de planejamento de fármacos por apresentarem características interessantes em meios biológicos como estabilidade, toxicidade baixa, potência e seletividade quando complexadas com fármacos ou moléculas bioativas. Tal associação metal-fármaco culmina no aumento de possibilidades a partir de modificações na arquitetura da molécula, devido a variedade de números de coordenação e geometrias, estado de oxidação e reatividade, além das cargas gerais (PEACOCK e SANDLER, 2008). A atovaquona e o lapachol são naftoquinonas que possuem atividade antiparasitária previamente conhecidas. A atovaquona é um medicamento já bem utilizado em associação com o proguanil, os quais possuem grande importância no tratamento e na profilaxia da malária, agindo na cadeia de transferência de elétrons na mitocôndria, e essencial na respiração celular no parasito. Já é conhecida a atividade antiplasmodial do lapachol e seus derivados (lapachona e β -lapachona), e por isso vêm sendo investigada como protótipo para moléculas com potencial antiparasitário.

Os complexos metálicos [RuCl(ato)terpy]PF₆ (Derivado 1), [RuCl(ato)(dppb)] (Derivado 2), [RuCl(lap)terpy] (Derivado 3) e [RuCl(lap)(dppb)] (Derivado 4) foram testados nas formas assexuadas de diferentes cepas de *P. falciparum*, sendo duas delas sensíveis (3d7 e D10) e uma resistente à cloroquina. Dentre os compostos testados, apenas o Derivado 1 foi capaz de inibir a proliferação dos parasitos, com valores de CI₅₀ de 12±0,7 nM, 13±5,0 nM e 41±19,0 nM nas cepas 3d7, D10 e W2,

respectivamente. Os Derivados 1 e 2 possuem características estruturais em comum, como a atovaquona e o rutênio, porém apresentaram comportamentos diferentes. Uma característica dos íons metálicos é a capacidade de dissociação em solução (PEACOCK e SANDLER, 2008; MACEDO et al., 2016). Talvez as diferenças estruturais presentes no Derivado 1, e ausentes no Derivado 2, tenham permitido a dissociação do metal e conseqüente atividade antiplasmodial. O Derivado 1 foi mais potente frente à cepa 3d7 (CI_{50} 12 nM), enquanto que na cepa W2 foi cerca de 3 vezes menos. Mesmo apresentando CI_{50} maior na cepa resistente (W2), é importante destacar que, comparado a cloroquina, o Derivado 1 foi cerca de 11 vezes mais potente. Nenhum dos compostos testados foi tão potente quanto a ATV. Porém, o Derivado 1 apresentou valores de CI_{50} na faixa de nanomolar, diferentemente do Derivado 2, o qual não foi possível ser calculado. A ATV é um fármaco potente contra o plasmódio. No entanto, o rápido desenvolvimento de resistência do parasito é a principal limitação desse medicamento (SIREGAR et al., 2015), o que ainda não é possível afirmar sobre Derivado 1. Os Derivados 3 e 4 exibiram perfil antiplasmodial significativo quando comparados ao lapachol. Um estudo prévio realizado por nosso grupo evidenciou que complexos metálicos rutênio-lapachol são em até 50 vezes mais potente do que apenas a molécula base (BARBOSA et al., 2014), o que confirma que essa associação é interessante na inibição do parasito.

Além da potência como antiparasitários, um outro aspecto importante é a toxicidade, visto que muitos candidatos à fármacos antimaláricos falham por conta desse aspecto. Os derivados foram testados quanto a toxicidade em células de mamíferos. Podemos afirmar que os compostos não foram tóxicos nas células testadas (HepG2 e J774), quando comparados com os valores de CI_{50} . Apenas o Derivado 1 apresentou potente atividade antiplasmodial e exibiu alta seletividade para o *P. falciparum*, cerca de 6666 e 2500 para HepG2 e J774, respectivamente. Tais achados dão indícios de que o Derivado 1 apresenta janela terapêutica ampla, sendo uma alternativa farmacológica segura (NWAKA et al., 2009). Num recente estudo realizado por Rylands et al. (2019) foi comparada a atividade antiplasmodial de diferentes complexos metálicos baseados em rutênio (II), ródio (III) e irídio (III) frente à duas cepas de *P. falciparum*, uma sensível à cloroquina (NF54) e outra resistente à múltiplas drogas (K1). Este trabalho evidenciou que o complexo metálico

mais potente foi o que possuía o rutênio em sua estrutura para a cepa NF54, com valor de CI_{50} de 0,59 μM , enquanto o complexo com irídio e ródio obtiveram 1,94 μM e 5,17 μM , respectivamente. Entretanto, nenhum dos fármacos experimentais testados foram ativos na cepa K1. Acredita-se que drogas baseadas em rutênio mimetizem as interações do ferro se ligando à albumina e transferrina. Tal vantagem permite a interação dessas drogas em condições biológicas e aumenta o potencial efeito antiplasmodial (GUO et al., 2013; RYLANDS et al., 2019).

O grande desafio no planejamento de fármacos antimaláricos é encontrar alternativas terapêuticas que ajam em todas as formas evolutivas do parasito e que não apresentem efeitos adversos nos pacientes (BAKSHI et al., 2018; HELLER e ROEPE, 2018). Além de avaliar a toxicidade dos compostos em células de linhagem, é necessário observar se os candidatos à novos fármacos agem diretamente no parasito por mecanismos complexos, e não hemolisando os eritrócitos infectados. Seguindo esse princípio, avaliamos a capacidade hemolítica dos Derivados e o lapachol. Nossos resultados evidenciaram que todos os derivados (1-4) não causaram hemólise nas concentrações testadas *in vitro*. Apenas o lapachol foi capaz de induzir aproximadamente 2% de hemólise na maior concentração testada (50 μM).

O sistema antioxidante dos tióis dependentes de NADPH é o mais importante mecanismo de defesa contra espécies reativas de oxigênio no parasito. Nesse sistema está incluso a glutathiona reduzida (GSH), a qual está envolvida na sobrevivência do plasmódio através da manutenção do equilíbrio redox no citosol, principalmente durante o processo de digestão da hemoglobina (MULLER et al., 2011). Baseado nos resultados promissores anteriores dos Derivados 1 e 2, e investigando os possíveis mecanismos de ação, avaliamos a capacidade dos compostos em se ligar à glutathiona reduzida. Dentre os resultados obtidos, observamos que o Derivado 1 foi fármaco que exibiu o melhor perfil de ligação com o GSH semelhante ao controle positivo (AuP), enquanto o Derivado 2 não apresentou tal atividade. É importante destacar que o precursor inibiu GSH em todas as concentrações testadas, sendo que na concentração de 1 mM apresentou inibição de 100%. Por outro lado, a atovaquona não exibiu valores significativos de inibição em nenhuma das concentrações. Tais achados demonstram que o rutênio pode possuir importante função na ação do fármaco por essa via, já que esse metal

pode agir na cadeia redox do parasito e ser reduzido de Ru (III) para Ru (II), o qual é mais ativo (PEACOCK e Sandler, 2008; BARBOSA et al., 2014). A ligação do complexo rutênio-atovaquona ao GSH nos trouxe a hipótese de que essa associação agiria como um sistema de entrega de fármaco ou direcionando a molécula para o sítio de ação, desencadeando no processo de morte do parasito. Estudos futuros são necessários para demonstrar se no ambiente celular o complexo rutênio-atovaquona inativa a GSH, e se tal efeito contribui para a inibição do crescimento do parasito.

O desenvolvimento da malária está diretamente associado aos hospedeiros do parasito. Os acessos febris, calafrios, sudorese e anemia são resultantes do aumento da parasitemia, digestão da hemoglobina e o rompimento dos eritrócitos infectados no hospedeiro secundário (ASHLEY et al., 2018). Durante o planejamento de fármacos, uma etapa crucial na avaliação da eficácia de uma possível terapia é o desempenho em organismos vivos. Para isso, no presente estudo, avaliamos o comportamento dos Derivados 1 e 2 *in vivo* a partir do modelo experimental de malária de Peters (PETERS et al., 1975). Tal modelo é importante durante o período experimental pois recapitula muitos aspectos da doença em humanos, tais como a hiperparasitemia, anemia e mortalidade. Nossos achados demonstraram que ambos derivados diminuíram o percentual de parasitemia de forma significativa, em comparação ao grupo veículo. Porém, o Derivado 1 exibiu melhor eficácia *in vivo* que o Derivado 2, na dose de 15,6 $\mu\text{mol/kg}$, suprimindo a parasitemia semelhante à atovaquona, fármaco referência. Consequentemente, o Derivado 1 aumentou o tempo de sobrevivência dos animais, confirmando a eficácia do composto *in vivo* contra o *P. berghei*. O Derivado 2 foi testado também na dose de 46,7 $\mu\text{mol/kg}$. Porém, não foi tão eficaz quanto o Derivado 1 e atovaquona. O aumento da eficácia *in vivo* a partir da complexação de metais e fármacos já foi previamente evidenciado. Macedo et al. (2016 e 2017) demonstrou que complexos metálicos platina-cloroquina e rutênio-cloroquina apresentam potência *in vitro* e eficácia *in vivo*. Foi observado também nesses dois estudos que a presença do metal exibe atividade não só inibindo a formação de cristais de hemozoína, mas também podem agir na cadeia de transferência de elétrons mitocondrial do plasmódio no estágio sanguíneo. Além disso, os compostos diminuíram o percentual de parasitemia sanguínea e aumentou a sobrevida dos animais, confirmando, assim, a eficácia de complexos

organometálicos no combate dos parasitos e interrupção da doença.

A administração dos compostos foi realizada nos animais pela via subcutânea no dorso. Sabe-se que a via subcutânea tem um perfil de absorção mais lenta que as demais vias injetáveis e, portanto, têm sido usada amplamente em experimentos de supressão da malária experimental (PETERS et al., 1977; SIMMONS; BRICK, 1970), onde a absorção mais lenta das quatro doses consecutivas do antimalárico resulta em uma maior tempo de ação do fármaco. Além disso, os complexos metálicos com fosfinas apresentam lipofilicidade elevada (CAMARGO et al., 2018; GRANDIS et al., 2017) e, logo, a via subcutânea é uma rota de administração adequada para os estudos iniciais de eficácia. A observação de que os derivados apresentaram eficácia quando administrados por esta via indicam que os mesmos possuem lipofilicidade suficiente para serem absorvidos e biodistribuídos, sendo necessário no curso da investigação futura, avaliar a eficácia dos derivados em outras rotas de administração.

7 CONCLUSÃO

No presente trabalho nós avaliamos o potencial antiplasmodial de complexos metálicos baseados em rutênio-atovaquona e rutênio-lapachol. Nossos achados sugerem que a conjugação do rutênio à atovaquona resultaram nos melhores perfis antiparasitários. O Derivado 1 foi mais potente no estágio intraeritrocítico do plasmódio, com baixa toxicidade frente às células de mamíferos e com alta seletividade para o parasito. Nos ensaios *in vivo*, o Derivado 1 foi o que exibiu melhor eficácia, suprimindo a parasitemia de forma semelhante a atovaquona e aumentando o tempo de vida dos animais após o tratamento. Os dados obtidos neste trabalho são importantes na compreensão de fármacos baseados em rutênio, além de elucidar os possíveis mecanismos de ação do complexo inédito rutênio-atovaquona.

Em suma, nossos resultados evidenciaram que o Derivado 1 é um excelente candidato para o desenvolvimento de estudos mais aprofundados para investigação dos mecanismos de ação provenientes de tal composto. Além disso, é necessário avaliar se o Derivado 1 é capaz de desenvolver resistência no parasito, como ocorre com a atovaquona.

REFERÊNCIAS

AFOLAYAN, Funmilayo; ADEGBOLAGUN, Olayemi; IRUNGU, Beatrice *et al.* Antimalarial actions of *Lawsonia inermis*, *Tithonia diversifolia* and *Chromolaena odorata* in combination. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 191, p. 188-194, set. 2016.

ALESSIO, Enzo. Thirty Years of the Drug Candidate NAMI-A and the Myths in the Field of Ruthenium Anticancer Compounds: a personal perspective. **European Journal of Inorganic Chemistry**, v. 2017, n. 12, p. 1549-1560, 28 set. 2016.

ALIA, B.H.; BASHIR, A.K.; TANIRA, M.O.M.. Anti-Inflammatory, Antipyretic, and Analgesic Effects of *Lawsonia inermis* L (Henna) in Rats. **Pharmacology**, v. 51, n. 6, p. 356-363, 1995.

ANDRADE-NETO, Valter; GOULART, Marília; SILVA FILHO, Jorge *et al.* Antimalarial activity of phenazines from lapachol, β -lapachone and its derivatives *against Plasmodium falciparum in vitro* and *Plasmodium berghei in vivo*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 14, n. 5, p. 1145-1149, mar. 2004.

ARAÚJO, Iasmin Aparecida; PAULA, Renata Cristina; ALVES, Ceres Luciana *et al.* Efficacy of lapachol on treatment of cutaneous and visceral *leishmaniasis*. **Experimental Parasitology**, v. 199, p. 67-73, abr. 2019.

ASHLEY, Elizabeth; PHYO, Aung; WOODROW, Charles. Malaria. **The Lancet**, v. 391, n. 10130, p. 1608-1621, abr. 2018.

BAKSHI, Rahul; TATHAM, Lee; SAVAGE, Alison *et al.* Long-acting injectable atovaquone nanomedicines for malaria prophylaxis. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 1-8, 22 jan. 2018.

BANGHAM, A. D.; HORNE, R. W. Action of Saponin on Biological Cell Membranes. **Nature**, v. 196, n. 4858, p. 952-953, dez. 1962.

BARBOSA, Marília; CORRÊA, Rodrigo; OLIVEIRA, Katia Mara *et al.* Antiparasitic activities of novel ruthenium/lapachol complexes. **Journal of Inorganic**

Biochemistry, v. 136, p.33-39, jul. 2014.

BIAGINI, Giancarlo; VIRIYAVEJAKUL, Parnpen; O'NEILL, Paul *et al.* Functional Characterization and Target Validation of Alternative Complex I of *Plasmodium falciparum* Mitochondria. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 50, n. 5, p. 1841-1851, maio 2006.

BOLTON, Judy; DUNLAP, Tareisha. Formation and Biological Targets of Quinones: Cytotoxic versus Cytoprotective Effects. **Chemical Research In Toxicology**, v. 30, n. 1, p.13-37, 29 set. 2016.

BOLTON, Judy; TRUSH, Michael; PENNING, Trevor *et al.* Terrence. Role of Quinones in Toxicology†. **Chemical Research In Toxicology**, v. 13, n. 3, p. 135-160, mar. 2000.

BOOTHMAN, David; TRASK, Douglas; PARDEE, Arthur. Inhibition of Potentially Lethal DNA Damage Repair in Human Tumor Cells by β -Lapachone, an Activator of Topoisomerase. **Cancer Research**, v. 49, p. 605 - 612, 1 fev. 1989.

BRANDÃO, Geraldo Célio; MISSIAS, Franciele; ARANTES, Lucas Miquéias *et al.* Antimalarial naphthoquinones. Synthesis via click chemistry, *in vitro* activity docking to PfDHODH and SAR of lapachol-based compounds. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 145, p. 191-205, fev. 2018.

BRANDELLI, Adriano *et al.* Antimicrobial activity of 1,4-naphthoquinones by metal complexation. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 40, n. 2, p.247-253, jun. 2004.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Descrição do processo de monitoramento dos testes de diagnóstico rápido de malária, Brasil, 2014 a 2016**. Secretaria de Vigilância em Saúde. v. 50, p. 1 – 9, mar. 2019.

CAMARDA, Grazia; JIRAWATCHARADECH, Piyaporn; PRIESTLEY, Richard *et al.* Antimalarial activity of primaquine operates via a two-step biochemical relay. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 1-9, 19 jul. 2019.

CAMARGO, Mariana; GRANDIS, Rone; SILVA, Monize *et al.* Determination of *in vitro* absorption in Caco-2 monolayers of anticancer Ru(II)-based complexes acting as dual human topoisomerase and PARP inhibitors. **Biometals**, v. 32, n. 1, p. 89-100, 30 nov. 2018.

CARNEIRO, Paula; PINTO, Maria; MARRA, Roberta *et al.* Synthesis and antimalarial activity of quinones and structurally-related oxirane derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 108, p. 134-140, jan. 2016.

CÉSPEDES, Nora; SUEN, Connie; KOEPFLI, Cristian *et al.* Natural immune response to *Plasmodium vivax* alpha-helical coiled coil protein motifs and its association with the risk of *P. vivax* malaria. **Plos One**, v. 12, n. 6, p.2787-2801, 26 jun. 2017.

CHEN, Catherine; GUI, Xiao; KAPPEN, Peter *et al.* The effect of charge on the uptake and resistance to reduction of platinum(iv) complexes in human serum and whole blood models. **Metallomics**, v. 12, n. 10, p. 1599-1615, 2020.

COMBRINCK, Jill; FONG, Kim; GIBHARD, Liezl *et al.* Optimization of a multi-well colorimetric assay to determine haem species in *Plasmodium falciparum* in the presence of anti-malarials. **Malaria Journal**, v. 14, n. 1, p. 1-14, 24 jun. 2015.

CORONADO, Lorena M.; NADOVICH, Christopher T.; SPADAFORA, Carmenza. Malarial hemozoin: from target to tool. *Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - General Subjects*, v. 1840, n. 6, p. 2032-2041, jun. 2014.

COWMAN, Alan; HEALER, Julie; MARAPANA, Danushka *et al.* Malaria: Biology and Disease. **Cell**, v. 167, n. 3, p.610-624, out. 2016.

COX, Gb; GIBSON, F. The role of shikimic acid in the biosynthesis of vitamin K2. **Biochemical Journal**, v. 100, n. 1, p.1-6, jul. 1966.

CUNICO, Wilson; CARVALHO, Samir; GOMES, Claudia *et al.* Fármacos antimalariais - história e perspectivas. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 89, p. 49 – 55, 2008.

DAHER, André; SILVA, Júlio; STEVENS, Antony *et al.* Evaluation of *Plasmodium*

vivax malaria recurrence in Brazil. **Malaria Journal**, v. 18, n. 1, p.1-10, 22 jan. 2019.

DEAN, Tyler; YANG, Mu; LIU, Mingyong *et al.* Human Serum Albumin-Delivered [Au(PEt₃)]⁺ Is a Potent Inhibitor of T Cell Proliferation. **Acs Medicinal Chemistry Letters**, v. 8, n. 5, p. 572-576, 25 abr. 2017.

DESPOMMIER, Dickson; Griffin, Daniel; Gwadz, Robert *et al.* Parasitics Diseases. 6^a edição. Nova Iorque: **Parasites Without Borders**, Inc., 2017.

DHANARAJ, Justin; JOHNSON, Jijo. Quinoxaline based bio-active mixed ligand transition metal complexes: Synthesis, characterization, electrochemical, antimicrobial, DNA binding, cleavage, antioxidant and molecular docking studies. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 151, p.100-109, out. 2015.

DIAS, Rosane; ARAÚJO, Taís; FREITAS, Raíza *et al.* β -Lapachone and its iodine derivatives cause cell cycle arrest at G2/M phase and reactive oxygen species-mediated apoptosis in human oral squamous cell carcinoma cells. **Free Radical Biology And Medicine**, v. 126, p. 87-100, out. 2018.

DOOLAN, D. L.; DOBANO, C.; BAIRD, J. K. Acquired Immunity to Malaria. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 1, p.13-36, 1 jan. 2009.

EHRHARDT, Katharina; DAVIOUD-CHARVET, Elisabeth; KE, Hangjun *et al.* The Antimalarial Activities of Methylene Blue and the 1,4-Naphthoquinone 3-[4-(Trifluoromethyl)Benzyl]-Menadione Are Not Due to Inhibition of the Mitochondrial Electron Transport Chain. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 57, n. 5, p. 2114-2120, 25 fev. 2013.

FAMIN, Oleg; GINSBURG, Hagai. Differential effects of 4-aminoquinoline-containing antimalarial drugs on hemoglobin digestion in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. **Biochemical Pharmacology**, v. 63, n. 3, p. 393-398, fev. 2002.

FARNERT, A. Evidence of *Plasmodium falciparum* malaria resistant to atovaquone and proguanil hydrochloride: case reports. **Bmj**, v. 326, n. 7390, p. 628-629, 22 mar. 2003.

FOOTE, S. J.; GALATIS, D.; COWMAN, A. F. Amino acids in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene of *Plasmodium falciparum* involved in cycloguanil resistance differ from those involved in pyrimethamine resistance. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 87, n. 8, p. 3014-3017, 1 abr. 1990.

FRANÇA, Tanos.; SANTOS, Marta; FIGUEROA-VILLAR, José. Malária: aspectos históricos e quimioterapia. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p.1271-1278, 2008.

GARAVITO, Giovanni; MONJE, Marie-Carmen; MAUREL, Séverine *et al.* A non-radiolabeled heme–GSH interaction test for the screening of antimalarial compounds. **Experimental Parasitology**, v. 116, n. 3, p. 311-313, jul. 2007.

GLANS, Lotta; HU, Wanning; JÖST, Christian *et al.* Synthesis and biological activity of cymantrene and cyrhetrene 4-aminoquinoline conjugates against malaria, leishmaniasis, and trypanosomiasis. **Dalton Transactions**, v. 41, n. 21, p.6443-6450, 2012.

GOKHALE, Nikhil; PADHYE, Subhash; CROFT, Simon *et al.* Transition metal complexes of buparvaquone as potent new antimalarial agents. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 95, n. 4, p. 249-258, jul. 2003.

GRANDIS, Rone; CAMARGO, Mariana; SILVA, Monize *et al.* Human topoisomerase inhibition and DNA/BSA binding of Ru(II)–SCAR complexes as potential anticancer candidates for oral application. **Biomaterials**, v. 30, n. 3, p. 321-334, 16 mar. 2017.

GRANDIS, Rone; Santos, Patrick Wellington; Oliveira, Katia Mara *et al.* Novel lawsone-containing ruthenium (II) complexes: synthesis, characterization and anticancer activity on 2d and 3d spheroid models of prostate cancer cells. **Bioorganic Chemistry**, v. 85, p. 455-468, abr. 2019.

GRIFFITH, Kevin; LEWIS, Linda; MALI, Sonja; PARISE, Monica. Treatment of Malaria in the United States. **Jama**, v. 297, n. 20, p. 2264-2277, 23 maio 2007.

Guidelines for treatment of malaria, 3^a ed. **World Health Organization**, 2015

GUO, Wei; ZHENG, Wei; LUO, Qun *et al.* Transferrin serves as a mediator to deliver organometallic ruthenium (II) anticancer complexes into cells. **Inorganic Chemistry**, v. 52, n. 9, p. 5328-5338, 15 abr. 2013.

HELLER, Laura; ROEPE, Paul. Quantification of Free Ferriprotoporphyrin IX Heme and Hemozoin for Artemisinin Sensitive versus Delayed Clearance Phenotype *Plasmodium falciparum* Malarial Parasites. **Biochemistry**, v. 57, n. 51, p.6927-6934, 4 dez. 2018.

HOLTKAMP, Hannah; MOVASSAGHI, Sanam; MORROW, Stuart *et al.* Metallomic study on the metabolism of RAPTA-C and cisplatin in cell culture medium and its impact on cell accumulation. **Metallomics**, v. 10, n. 3, p. 455-462, 2018.

IMAI, Takeshi; KURIHARA, Tatsuo; ESAKI, Nobuyoshi *et al.* Selective fluorescence detection method for selenide and selenol using monochlorobimane. **Analytical Biochemistry**, v. 532, p. 1-8, set. 2017.

ISMAIL, Khadiga; IBRAHIM, Ayman; AHMED, Mona *et al.* Comparison between the effect of Lawsonia inermis and flubendazole on Strongyloides species using scanning electron microscopy. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 40, n. 2, p. 415-422, 24 ago. 2014.

JÁCOME, Rose; OLIVEIRA, Alaíde; RASLAN, Délio *et al.* Análise de naftoquinonas em extratos brutos de raízes de Zeyheria montana M. (bolsa-de-pastor). **Química Nova**, v. 22, n. 2, p. 175-177, abr. 1999.

JARDIM, Guilherme; GUIMARÃES, Tiago; PINTO, Maria do Carmo *et al.* Naphthoquinone-based chalcone hybrids and derivatives: synthesis and potent activity against cancer cell lines. **Medchemcomm**, v. 6, n. 1, p.120-130, 2015.

KANDIOLLER, Wolfgang; BALSANO, Evelyn; MEIER, Samuel *et al.* Organometallic anticancer complexes of lapachol: metal centre-dependent formation of reactive oxygen species and correlation with cytotoxicity. **Chemical Communications**, v. 49, n. 32, p. 3348-3350, 2013.

KASOZI, Denis; MOHRING, Franziska; RAHLFS, Stefan *et al.* Real-Time Imaging of the Intracellular Glutathione Redox Potential in the Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*. **Plos Pathogens**, v. 9, n. 12, p. 1-18, 5 dez. 2013.

KAZIMI, Syed; IQBAL, Mohammad; MULLIGAN, Christopher *et al.* Ligand Exchange/Scrambling Study of Gold (I)-Phosphine Complexes in the Solid Phase by DESI-MS Analysis. **Journal of the American Society For Mass Spectrometry**, v. 30, n. 11, p. 2289-2296, 9 set. 2019.

KAZMIN, Dmitri; NAKAYA, Helder; LEE, Eva *et al.* Systems analysis of protective immune responses to RTS,S malaria vaccination in humans. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 9, p.2425-2430, 13 fev. 2017.

KE, Hangjun; GANESAN, Suresh; DASS, Swati *et al.* Mitochondrial type II NADH dehydrogenase of *Plasmodium falciparum* (PfNDH2) is dispensable in the asexual blood stages. **Plos One**, [v. 14, n. 4, p. 1-16, 9 abr. 2019.

KELLY-HOPE, Louise; HEMINGWAY, Janet; MCKENZIE, F Ellis. Environmental factors associated with the malaria vectors *Anopheles gambiae* and *Anopheles funestus* in Kenya. **Malaria Journal**, v. 8, n. 1, p.1-8, 26 nov. 2009.

KESSL, Jacques; LANGE, Benjamin; MERBITZ-ZAHRADNIK, Torsten *et al.* Molecular Basis for Atovaquone Binding to the Cytochrome *bc1* Complex. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 33, p. 31312-31318, 5 jun. 2003.

KIMURA, Daisuke; MIYAKODA, Mana; KIMURA, Kazumi *et al.* Interleukin-27-Producing CD4 + T Cells Regulate Protective Immunity during Malaria Parasite Infection. **Immunity**, v. 44, n. 3, p.672-682, mar. 2016.

KOCH, Marion; BAUM, Jake. The mechanics of malaria parasite invasion of the human erythrocyte – towards a reassessment of the host cell contribution. **Cellular Microbiology**, v. 18, n. 3, p.319-329, 11 jan. 2016.

KUMAGAI, Yoshito; SHINKAI, Yasuhiro; MIURA, Takashi *et al.* The Chemical Biology of Naphthoquinones and Its Environmental Implications. **Annual Review of**

Pharmacology and Toxicology, v. 52, n. 1, p.221-247, 10 fev. 2012.

KUMAR, Deepak; KHAN, Shabana; TEKWANI, Babu *et al.* 4-Aminoquinoline-Pyrimidine hybrids: Synthesis, antimalarial activity, heme binding and docking studies. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 89, p.490-502, jan. 2015.

KUPPUSAMY, Palaniselvam; YUSOFF, Mashitah; MANIAM, Gaanty *et al.* Biosynthesis of metallic nanoparticles using plant derivatives and their new avenues in pharmacological applications – An updated report. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 24, n. 4, p. 473-484, jul. 2016.

LANGHORNE, Jean; DUFFY, Patrick. Expanding the antimalarial toolkit: Targeting host–parasite interactions. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 213, n. 2, p.143-153, 1 fev. 2016.

LA-SCALEA, Mauro; SILVA, Hélio; FERREIRA, Elizabeth. Redução voltamétrica de artemisinina e sua interação com grupo heme (hemina). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 3, p. 371-383, set. 2007

LAZARUS, M. D.; SCHNEIDER, T. G.; TARASCHI, T. F. A new model for hemoglobin ingestion and transport by the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Journal of Cell Science**, v. 121, n. 11, p. 1937-1949, 6 maio 2008.

LEMOS, Telma; MONTE, Francisco; SANTOS, Allana Kellen *et al.* Quinones from plants of northeastern Brazil: structural diversity, chemical transformations, nmr data and biological activities. **Natural Product Research**, v. 21, n. 6, p. 529-550, 20 maio 2007.

LI, Xiao; KONDRASHIN, Anatoly; GREENWOOD, Brian *et al.* A Historical Review of WHO Certification of Malaria Elimination. **Trends In Parasitology**, v. 35, n. 2, p. 163-171, fev. 2019.

LIN, Jing-wen; SPACCAPELO, Roberta; SCHWARZER, Evelin *et al.* Replication of *Plasmodium* in reticulocytes can occur without hemozoin formation, resulting in chloroquine resistance. **The Journal Of Experimental Medicine**, v. 212, n. 6, p.893-

903, 4 maio 2015.

LINZNER, Nico; FRITSCH, Verena; BUSCHE, Tobias *et al.* The plant-derived naphthoquinone lapachol causes an oxidative stress response in *Staphylococcus aureus*. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 158, p. 126-136, out. 2020.

LIOU, Jing-ru; EL-SHAZLY, Mohamed; DU, Ying-Chi *et al.* 1,5-Diphenylpent-3-en-1-ynes and methyl naphthalene carboxylates from *Lawsonia inermis* and their anti-inflammatory activity. **Phytochemistry**, v. 88, p.67-73, abr. 2013.

LUZOLO, Ange Landela; NGOYI, Dieudonné Mumba. Cerebral malaria. **Brain Research Bulletin**, v. 145, p.53-58, fev. 2019.

MA, Wenchuan; BALTA, Victoria; WEST, Rachel *et al.* A Second Mechanism Employed by Artemisinins to Suppress *Plasmodium falciparum* Hinges on Inhibition of Hematin Crystallization. **Journal of Biological Chemistry**, p. 1-12, 25 nov. 2020.

MACEDO, Taís; COLINA-VEGAS, Legna; PAIXÃO, Marcelo da *et al.* Chloroquine-containing organoruthenium complexes are fast-acting multistage antimalarial agents. **Parasitology**, v. 143, n. 12, p.1543-1556, 21 jul. 2016.

MACEDO, Taís; VILLARREAL, Wilmer; COUTO, Camila *et al.* Platinum(ii)-chloroquine complexes are antimalarial agents against blood and liver stages by impairing mitochondrial function. **Metallomics**, v. 9, n. 11, p. 1548-1561, 2017.

MAKLER, Michael; HINRICHS, David. Measurement of the lactate dehydrogenase activity of *Plasmodium falciparum* as an assessment of parasitemia. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 48, 205–210. 1993

MATA-SANTOS, Taís; PINTO, Nitza; MATA-SANTOS, Hilton Antônio *et al.* Anthelmintic activity of lapachol, β -lapachone and its derivatives against *Toxocara canis* LARVAE. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57, n. 3, p. 197-204, jun. 2015.

MATCZUK, Magdalena; PRZĄDKA, Monika; ALEKSENKO, Svetlana *et al.* Metallomics for drug development: a further insight into intracellular activation

chemistry of a ruthenium (iii)-based anticancer drug gained using a multidimensional analytical approach. **Metallomics**, v. 6, n. 1, p. 147-153, 2014.

MATHER, Michael; DARROUZET, Elisabeth; VALKOVA-VALCHANOVA, Maria *et al.* Uncovering the Molecular Mode of Action of the Antimalarial Drug Atovaquone Using a Bacterial System. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 29, p. 27458-27465, 24 maio 2005.

MAYOR, Alfredo; DOBAÑO, Carlota; NHABOMBA, Augusto *et al.* IgM and IgG against *Plasmodium falciparum* lysate as surrogates of malaria exposure and protection during pregnancy. **Malaria Journal**, v. 17, n. 1, p.1-10, 10 maio 2018.

MCKEAGE, Kate; SCOTT, Lesley. Atovaquone/Proguanil. **Drugs**, v. 63, n. 6, p. 597-623, 2003.

MEIBALAN, Elamaran; MARTI, Matthias. Biology of Malaria Transmission. **Cold Spring Harbor Perspectives In Medicine**, v. 7, n. 3, p.1-15, 11 nov. 2016.

MESHNICK, Steven. Artemisinin: mechanisms of action, resistance and toxicity. **International Journal For Parasitology**, v. 32, n. 13, p.1655-1660, dez. 2002.

MEYER, George; NARANJO, Maria; WIDHALM, Joshua. Convergent evolution of plant specialized 1,4-naphthoquinones: metabolism, trafficking, and resistance to their allelopathic effects. **Journal of Experimental Botany**, p. 1-9, 1 dez. 2020.

MOHRING, Franziska; RAHBARI, Mahsa; ZECHMANN, Bernd *et al.* Determination of glutathione redox potential and pH value in subcellular compartments of malaria parasites. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 104, p. 104-117, mar. 2017.

MONKS, Terrence; JONES, Douglas. The Metabolism and Toxicity of Quinones, Quinonimines, Quinone Methides, and Quinone-Thioethers. **Current Drug Metabolism**, v. 3, n. 4, p.425-438, 1 ago. 2002.

MOREIRA, Diogo; SÁ, Matheus; MACEDO, Taís *et al.* Evaluation of naphthoquinones identified the acetylated isolapachol as a potent and selective

antiplasmodium agent. **Journal Of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 30, n. 4, p. 615-621, 28 nov. 2014.

MÜLLER, Ingrid; HYDE, John. Antimalarial drugs: modes of action and mechanisms of parasite resistance. **Future Microbiology**, v. 5, n. 12, p. 1857-1873, dez. 2010.

MÜLLER, Sylke. Role and Regulation of Glutathione Metabolism in *Plasmodium falciparum*. **Molecules**, v. 20, n. 6, p. 10511-10534, 8 jun. 2015.

MÜLLER, Tobias; KOCHI, Jay. Glutathione Reductase-Catalyzed Cascade of Redox Reactions To Bioactivate Potent Antimalarial 1,4-Naphthoquinones – A New Strategy to Combat Malarial Parasites. **Journal Of The American Chemical Society**, v. 133, n. 30, p.11557-11571, 3 ago. 2011.

NASCIMENTO, Maria Fernanda; BORGATI, Tatiane; SOUZA, Larissa Camila *et al.* In silico, *in vitro* and *in vivo* evaluation of natural Bignoniaceous naphthoquinones in comparison with atovaquone targeting the selection of potential antimalarial candidates. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 401, p. 1-44, ago. 2020.

NEVES, Sara; CARVALHO, Nanashara; SILVA, Monize *et al.* Ruthenium Complexes Containing Heterocyclic Thioamidates Trigger Caspase-Mediated Apoptosis Through MAPK Signaling in Human Hepatocellular Carcinoma Cells. **Frontiers In Oncology**, v. 9, p.1-18, 9 jul. 2019.

NJABO, K. Y.; CORNEL, A. J.; BONNEAUD, C. *et al.* Nonspecific patterns of vector, host and avian malaria parasite associations in a central African rainforest. **Molecular Ecology**, v. 20, n. 5, p.1049-1061, 6 dez. 2010.

NLINWE, Omarine Nfor; KUSI, Kwadwo Asamoah; ADU, Bright; SEDEGAH, Martha. T-cell responses against Malaria: effect of parasite antigen diversity and relevance for vaccine development. **Vaccine**, v. 36, n. 17, p. 2237-2242, abr. 2018.

OLAFSON, Katy; KETCHUM, Megan; RIMER, Jeffrey *et al.* Mechanisms of hematin crystallization and inhibition by the antimalarial drug chloroquine. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, v. 112, n. 16, p.4946-4951, 23 mar. 2015.

OLAFSON, Katy; NGUYEN, Tam; RIMER, Jeffrey *et al.* Antimalarials inhibit hematin crystallization by unique drug–surface site interactions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 29, p. 7531-7536, 30 maio 2017.

OLIVEIRA, Katia; LIANY, Luna-Dulcey; CORRÊA, Rodrigo *et al.* Selective Ru(II)/lawsone complexes inhibiting tumor cell growth by apoptosis. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 176, p.66-76, nov. 2017.

OLIVEIRA, Katia; HONORATO, João; DEMIDOFF, Felipe *et al.* Lapachol in the Design of a New Ruthenium(II)-Diphosphine Complex as a Promising Anticancer Metallodrug. **Journal Of Inorganic Biochemistry**, v. 214, p. 1-35, jan. 2021.

OLIVEIRA, Katia; PETERSON, Erica; CARROCCIA, Murilo *et al.* Ru(ii)-Naphthoquinone complexes with high selectivity for triple-negative breast cancer. **Dalton Transactions**, v. 49, n. 45, p. 16193-16203, 2020.

ORAMAS-ROYO, Sandra; TORREJÓN, Concepción; CUADRADO, Irene *et al.* Synthesis and cytotoxic activity of metallic complexes of lawsone. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 9, p.2471-2477, maio 2013.

ORJUELA-SANCHEZ, Pamela; VILLA, Zaira Hellen; MORENO, Marta *et al.* A. Developing *Plasmodium vivax* Resources for Liver Stage Study in the Peruvian Amazon Region. **Acs Infectious Diseases**, v. 4, n. 4, p. 531-540, 15 mar. 2018.

PAGOLA, Silvina; STEPHENS, Peter; BOHLE, D. Scott *et al.* The structure of malaria pigment β -haematin. **Nature**, v. 404, p. 307 – 310, 16 març. 2000.

PAINTER, Heather; MORRISEY, Joanne; MATHER, Michael *et al.* Specific role of mitochondrial electron transport in blood-stage *Plasmodium falciparum*. **Nature**, v. 446, n. 7131, p. 88-91, mar. 2007.

PAPAGEORGIU, Vassilios; ASSIMOPOULOU, Andreana; COULADOUROS, Elias *et al.* David. The chemistry and biology of alkannin, shikonin, and related naphthazarin natural products. **Angewdte Chemistry. Int.**, v.38, p. 270 - 300, 1999.

PEACOCK, Anna; SADLER, Peter. Medicinal Organometallic Chemistry: designing

metal arene complexes as anticancer agents. **Chemistry - An Asian Journal**, v. 3, n. 11, p. 1890-1899, 13 nov. 2008.

PEREIRA, Caroline; QUADROS, Helenita; MOREIRA, Diogo Rodrigo *et al.* A Novel Hybrid of Chloroquine and Primaquine Linked by Gold(I): multitarget and multiphase antiplasmodial agent. **Chemmedchem**, p. 1-18, 24 nov. 2020.

PETERS, W.; HOWELLS, R.e.; PORTUS, J. *et al.* The chemotherapy of rodent malaria, XXVII Studies on mefloquine (WR 142,490). **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 71, n. 4, p. 407-418, dez. 1977.

PETERS, W.; PORTUS, J. H.; ROBINSON, B. L. The chemotherapy of rodent malaria, XXII: The value of drug-resistant strains of *P. berghei* in screening for blood schizontocidal activity. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 69, n. 2, p. 155-171, 1975

PHILLIPS, Margaret; LOTHARIUS, Julie; MARSH, Kennan *et al.* Sreekanth. A long-duration dihydroorotate dehydrogenase inhibitor (DSM265) for prevention and treatment of malaria. **Science Translational Medicine**, v. 7, n. 296, p. 1-12, 15 jul. 2015.

PINTO, Ana Yecê; VENTURA, Ana Maria; SOUZA, José Maria. Resposta de anticorpos IgG anti-*Plasmodium vivax* em crianças expostas à malária, antes e após tratamento específico. **Jornal de Pediatria**, v. 77, n. 4, p. 299 – 306, 2001.

PRICE, Ric; UHLEMANN, Anne-Catrin; BROCKMAN, Alan *et al.* Mefloquine resistance in *Plasmodium falciparum* and increased pfmdr1 gene copy number. **The Lancet**, v. 364, n. 9432, p. 438-447, jul. 2004.

QIU, Han-Yue; WANG, Peng-Fei; LIN, Hong-Yan *et al.* Naphthoquinones: a continuing source for discovery of therapeutic antineoplastic agents. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 91, n. 3, p. 681-690, 28 nov. 2017.

RAJASEKAR, Sakthidevi; KRISHNA, T. P. Adarsh; THARMALINGAM, Nagendran *et al.* Eleftherios. Metal-Free C-H Thiomethylation of Quinones Using Iodine and

DMSO and Study of Antibacterial Activity. **Chemistryselect**, v. 4, n. 8, p.2281-2287, 25 fev. 2019.

RYLANDS, Laa-lqa; WELSH, Athi; MAEPA, Keletso *et al.* Structure-activity relationship studies of antiplasmodial cyclometallated ruthenium (II), rhodium(III) and iridium(III) complexes of 2-phenylbenzimidazoles. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 161, p. 11-21, jan. 2019.

SANTOS, Elizabeth; CARNEIRO, José; FERREIRA, Vitor. Quantitative structure–activity relationship in aziridiny-1,4-naphthoquinone antimalarials: study of theoretical correlations by the pm3 method. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 1, p. 87-93, jan. 2004.

SARAF, Anita; CERVANTES, Serena; BUNNIK, Evelien *et al.* Dynamic and Combinatorial Landscape of Histone Modifications during the Intraerythrocytic Developmental Cycle of the Malaria Parasite. **Journal Of Proteome Research**, v. 15, n. 8, p.2787-2801, 24 jun. 2016.

SCHALL, Jos. Virulence of a Malaria Parasite, *Plasmodium mexicanum*, for Its Sand Fly Vectors, *Lutzomyia vexator* and *Lutzomyia stewarti* (Diptera: Psychodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 48, n. 6, p.1183-1188, 1 nov. 2011.

SCHUCK, Desiree; FERREIRA, Sabrina; CRUZ, Laura *et al.* Biological evaluation of hydroxynaphthoquinones as anti-malarials. **Malaria Journal**, v. 12, n. 1, p. 1-6, 2013.

SHARMA, Abhinay; SANTOS, Isabela O.; GAUR, Pratibha *et al.* Addition of thiols to o-quinone methide: new 2-hydroxy-3-phenylsulfanylmethyl[1,4]naphthoquinones and their activity against the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* (3d7). **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 59, p. 48-53, jan. 2013.

SICILIANO, Giulia; KUMAR, T.R. Santha; BONA, Roberta *et al.* A high susceptibility to redox imbalance of the transmissible stages of *Plasmodium falciparum* revealed with a luciferase-based mature gametocyte assay. **Molecular Microbiology**, v. 104, n. 2, p. 306-318, 21 fev. 2017

SILVA, Fernando; FERREIRA, Vitor Francisco. Natural Naphthoquinones with Great Importance in Medicinal Chemistry. **Current Organic Synthesis**, v. 13, n. 3, p.334-371, 6 abr. 2016.

SIMMONS, M. L.; BRICK, J. O. The Laboratory Mouse. Selection and Management. **Prentice-Hall: Englewood Cliffs**, New Jersey. 1970

SIMÕES, Luciano; ALVES JUNIOR, Eduardo; RIBATSKI-SILVA, Daniele *et al.* Factors associated with recurrent *Plasmodium vivax* malaria in Porto Velho, Rondônia State, Brazil, 2009. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 30, n. 7, p.1403-1417, jul. 2014.

SIQUEIRA, Andre; MESONES-LAPOUBLE, Oscar; MARCHESINI, Paola *et al.* *Plasmodium vivax* Landscape in Brazil: Scenario and Challenges. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, n. 6, p.87-96, 5 out. 2016.

SIREGAR, Josephine; KURISU, Genji; KOBAYASHI, Tamaki *et al.* Direct evidence for the atovaquone action on the *Plasmodium* cytochrome bc 1 complex. **Parasitology International**, v. 64, n. 3, p.295-300, jun. 2015.

SKRZYPEK, Ruth; CALLAGHAN, Richard. The “pushmi-pullyu” of resistance to chloroquine in malaria. **Essays In Biochemistry**, v. 61, n. 1, p.167-175, 3 mar. 2017.

SLATER, Andrew. Chloroquine: mechanism of drug action and resistance in *plasmodium falciparum*. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 57, n. 2-3, p. 203-235, jan. 1993.

SOUZA, Nicolli; ANDRADE, Isabel; CARNEIRO, Paula *et al.* Blood shizonticidal activities of phenazines and naphthoquinoidal compounds against *Plasmodium falciparum* *in vitro* and in mice malaria studies. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 5, p.546-552, 5 ago. 2014.

SRIVASTAVA, Indresh; VAIDYA, Akhil. A Mechanism for the Synergistic Antimalarial Action of Atovaquone and Proguanil. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 43, n. 6, p. 1334-1339, 1 jun. 1999.

STAINES, Henry; BURROW, Rebekah; TEO, Beatrix *et al.* Clinical implications of *Plasmodium* resistance to atovaquone/proguanil: a systematic review and meta-analysis. **Journal Of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 3, p.581-595, 11 dez. 2017.

STANWAY, Rebeccas; STRIEPEN, Boris. Organelle segregation into *Plasmodium* liver stage merozoites. **Cellular Microbiology**, v. 13, n. 11, p.1768-1782, 31 ago. 2011.

STRINGER, Tameryn; QUINTERO, Maria Alejandra; WIESNER, Lubbe *et al.* Evaluation of PTA-derived ruthenium (II) and iridium (III) quinoline complexes against chloroquine-sensitive and resistant strains of the *Plasmodium falciparum* malaria parasite. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 191, p.164-173, fev. 2019.

SULLIVAN, David. Quinolines block every step of malaria heme crystal growth. **Proceedings of The National Academy Of Sciences**, v. 114, n. 29, p.7483-7485, 10 jul. 2017.

TABRIZI, Leila; CHINIFOROSHAN, Hossein. Designing new iridium(iii) arene complexes of naphthoquinone derivatives as anticancer agents: a structure-activity relationship study. **Dalton Transactions**, v. 46, n. 7, p. 2339-2349, 2017.

TABRIZI, Leila; TALAIE, Faranak; CHINIFOROSHAN, Hossein. Copper(II), cobalt(II) and nickel(II) complexes of lapachol: synthesis, DNA interaction, and cytotoxicity. **Journal of Biomolecular Structure And Dynamics**, v. 35, n. 15, p.3330-3341, 26 dez. 2016.

TAVARES, Joana; FORMAGLIO, Pauline; THIBERGE, Sabine *et al.* Role of host cell traversal by the malaria sporozoite during liver infection. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 210, n. 5, p.905-915, 22 abr. 2013.

THAPAR, Mita; GUPTA, Seema; SPINDLER, Carl *et al.* Pharmacodynamic interactions among atovaquone, proguanil and cycloguanil against *Plasmodium falciparum* *in vitro*. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine And Hygiene**, v. 97, n. 3, p. 331-337, maio 2003.

The Malaria Atlas Project. < www.malariaatlas.org>. Acesso em 28/12/2020.

TU, Youyou. Artemisinin-A Gift from Traditional Chinese Medicine to the World (Nobel Lecture). **Angewandte Chemie International Edition**, v. 55, n. 35, p.10210-10226, 4 ago. 2016.

WALLACE, Daniel. The Use of Quinacrine (Atabrine) in Rheumatic Diseases: A Reexamination. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v. 18, n. 4, p. 282 – 297, 4 mai. 1989.

WEBB, Michael; WALSBY, Charles. EPR as a probe of the intracellular speciation of ruthenium(iii) anticancer compounds. **Metallomics**, v. 5, n. 12, p. 1624-1633, 2013.

WHO. World malaria report 2019. Geneva: **World Health Organization**, 2020.

WOLFARTH-COUTO, Bruna; FILIZOLA, Naziano; DURIEUX, Laurent. Padrão sazonal dos casos de malária e a relação com a variabilidade hidrológica no Estado do Amazonas, Brasil. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 23, p. 1-13, 2020.

World Health Organization. < <https://www.who.int>>. Acesso em 28/12/2020.

YANG, Annie; O'NEILL, Matthew; JENNISON, Charlie *et al.* Cell Traversal Activity Is Important for *Plasmodium falciparum* Liver Infection in Humanized Mice. **Cell Reports**, v. 18, n. 13, p.3105-3116, mar. 2017.

ZHANG, K. Divergent Regulation of Dihydrofolate Reductase Between Malaria Parasite and Human Host. **Science**, v. 296, n. 5567, p.545-547, 19 abr. 2002.