

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Aggeu Magalhães

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E
BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE

Laryssa Kathleen Mendonça Ferreira

**Investigação de novos compostos a base de naftoquinonas contra o
Plasmodium falciparum como estratégia terapêutica no controle da malária**

Recife

2022

Laryssa Kathleen Mendonça Ferreira

**Investigação de novos compostos a base de naftoquinonas contra o
Plasmodium falciparum como estratégia terapêutica no controle da malária**

Dissertação de Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde apresentado ao Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Orientadora:

Dra. Haiana Charifker Schindler

Coorientadora:

Dra. Lílian Maria Lapa Montenegro Pimentel

Recife

2022

Laryssa Kathleen Mendonça Ferreira

**Investigação de novos compostos a base de naftoquinonas contra o
Plasmodium falciparum como estratégia terapêutica no controle da malária**

Dissertação de Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde apresentado ao Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Aprovado em: 29 de janeiro de 2022.

BANCA EXAMINADORA

Dra. Valéria Pereira Hernandez
Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

Dra. Jaqueline Rodrigues da Silva
Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

Dra. Haiana Charifker Schindler
Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

À Deus, minha família e amigos que me deram forças durante toda essa longa jornada, dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me amparar nos momentos difíceis e me manter firme diante de todos os obstáculos que me deparei ao longo da caminhada, sem ele eu nada seria.

Aos meus pais, Mônica e João, por todo cuidado e amor. Por sempre me apoiarem e me incentivarem durante toda a minha vida escolar e acadêmica. Por serem meu maior exemplo de humildade e amor ao próximo, formando assim a pessoa que sou hoje.

Ao meu noivo, Carlos Eduardo, que foi meu ponto de paz durante toda essa jornada, sempre me incentivando e ajudando em todos os momentos de turbulência que me deparei, me mostrando o quão forte eu sou.

À todos os meus familiares por todo o suporte oferecido, sempre com muito amor e carinho.

À todos os meus amigos em especial a “família” LIE, mais conhecidos como “Tuberculetes” por todo os momentos bons que vivenciamos juntos, levarei vocês comigo pelo resto da minha vida. Obrigada por terem me recebido de braços abertos nessa família tão especial que é o LIE.

À Luanna, Jp, Romário e Dany, meus “presentinhos” da Fiocruz, por todo o companheirismo durante toda essa jornada. A amizade de vocês foi crucial para me manter firme durante toda a caminhada. Obrigada por serem vocês!

À Renata, por todo o suporte, atenção e dedicação fornecida a mim durante esses anos de mestrado.

À minha orientadora Haiana e coorientadora Lílian por toda dedicação, compreensão e oportunidade disponibilizada.

Ao Instituto Aggeu Magalhães por toda a infraestrutura oferecida.

Ao órgão de fomento CNPq, pelo apoio financeiro.

“Todo o conhecimento genuíno tem origem na experiência direta.” Mao Tse-Tung

RESUMO

FERREIRA, Laryssa Kathleen Mendonça. **Investigação de novos compostos a base de naftoquinonas contra o *Plasmodium falciparum* como estratégia terapêutica no controle da malária.** 2022. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2022.

Malária é uma doença infecciosa, causada por protozoários do gênero *Plasmodium* e transmitida pela fêmea do mosquito *Anopheles*. Dentre as espécies, o *P. falciparum* é a espécie responsável pela forma mais grave da doença e já existem cepas resistentes a todos os antimaláricos utilizados na quimioterapia, o que torna urgente a busca de novas classes de quimioterápicos capazes de combater o parasito causador da doença. Algumas naftoquinonas naturais surgiram como propostas promissoras de pesquisa de química medicinal, devido às suas propriedades estruturais e foram bem estudadas como possíveis candidatas contra o câncer e doenças parasitárias. O presente trabalho buscou investigar novos compostos derivados da 1,4-naftoquinona contendo o anel 1,2,3-triazólico contra o *Plasmodium falciparum* como possíveis candidatos a nova droga de uso clínico para o tratamento da malária. Os cinco candidatos a novos fármacos foram testados frente a cepa resistente do *P. falciparum* através da avaliação da ação antimalárica *in vitro*, citotoxicidade e ensaio de hemólise. Os parasitos foram cultivados em hemácias humanas do tipo O+ e posteriormente sincronizados, para assim entrarem em contato com as diferentes concentrações das drogas teste e a cloroquina, onde foi calculado o IC₅₀. A citotoxicidade foi avaliada frente a linhagem celular HepG2 e Vero, e o CC₅₀ foi determinado. O ensaio de hemólise foi realizado e o potencial hemolítico foi verificado por leitura espectrofotométrica a 450 nm. Os resultados obtidos demonstraram que os compostos derivados da 1,4-naftoquinona contendo o anel 1,2,3-triazólico desempenham uma atividade antiplasmodial satisfatória, com uma redução de parasitemia maior que 80% na maior concentração, índice de seletividade >10 na maioria dos compostos, e nenhum dos compostos-teste proporcionou hemólise significativa, sendo portanto compostos promissores.

Palavras-chave: malária; *Plasmodium falciparum*; naftoquinonas.

ABSTRACT

FERREIRA, Laryssa Kathleen Mendonça. **Investigation of new compounds based on naphthoquinones against or plasmodium falciparum as a therapeutic strategy does not control damage.** 2022. Dissertation (Masters in Biosciences and Biotechnology in Health) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2022.

Malaria is an infectious disease caused by protozoa of the genus *Plasmodium* and transmitted by the female *Anopheles* mosquito. Among the species, *P. falciparum* is the species responsible for the most severe form of the disease and there are already strains resistant to all antimalarials used in chemotherapy, which makes urgent the search for new classes of chemotherapy capable of combating the parasite that causes the disease. Some natural naphthoquinones have emerged as promising research proposals for medicinal chemistry, due to their structural properties and have been well studied as possible candidates against cancer and parasitic diseases. The present work sought to investigate new compounds derived from 1,4-naphthoquinone containing the 1,2,3-triazole ring against *Plasmodium falciparum* as possible candidates for a new drug for clinical use for the treatment of malaria. The five new drug candidates were tested against the resistant strain of *P. falciparum* through the evaluation of *in vitro* antimalarial action, cytotoxicity and hemolysis assay. The parasites were cultured in type O+ human red blood cells and later synchronized, in order to come into contact with the different concentrations of the test drugs and chloroquine, where the IC₅₀ was calculated. Cytotoxicity was evaluated against HepG2 and Vero cell lines, and CC₅₀ was determined. The hemolysis assay was performed and the hemolytic potential was verified by spectrophotometric reading at 450 nm. The results obtained showed that the compounds derived from 1,4-naphthoquinone containing the 1,2,3-triazole ring have a satisfactory antiplasmodial activity, with a reduction of parasitaemia greater than 80% at the highest concentration, a selectivity index >10 in most of the compounds, and none of the test compounds provided significant hemolysis, thus being promising compounds.

Key words: malária; *Plasmodium falciparum*; naphthoquinones.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Linha do tempo do PCNM com as principais atividades realizadas de 2003-2016.....	16
Figura 2 - Mapa do Brasil destacando as áreas de risco para malária pelos diferentes níveis de incidência parasitária anual.....	17
Figura 3 - Mapa da taxa de incidência de casos de malária (casos por 1.000 habitantes em risco) por país, 2018.....	18
Figura 4 - Tendências da taxa de incidência de casos de malária (casos por 1.000 habitantes em risco) globalmente e por região da OMS, 2010–2018.....	18
Figura 5 - Ciclo de vida do <i>Plasmodium</i> , agente causador da malária...	21
Figura 6 - Estrutura química dos Antimaláricos.....	27
Figura 7 - Mecanismo de ação dos antimaláricos.....	29
Figura 8 - Síntese do Ácido Fólico.....	32
Figura 9 - Estrutura química da orto e para-naftoquinona.....	33
Figura 10 - Estrutura química do Lapachol.....	34
Figura 11 - Equilíbrio tautomérico em 1,2,3- e 1,2,4-triazóis.....	35
Figura 12 - Derivados sintéticos da 1,4-naftoquinona.....	44
Figura 13 - Teste de hemólise referente as 7 diluições dos compostos 83, 84,85, e 87.....	51
Figura 14 – Teste de hemólise referente as 7 diluições do composto 88.....	51
Figura 15 - Teste de hemólise referente aos controles positivo (Triton) e negativo (salina).....	52
Figura 16 - Porcentagem de hemólise in vitro dos compostos 83, 84, 85, 87, 88.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Manifestações clínicas e laboratoriais indicativas da malária grave e complicada	24
Tabela 2 - CC50 dos compostos 83, 84,85, 87, 88	50
Tabela 3 - Atividade antimalárica in vitro dos compostos 83, 84, 85, 87 e 88 frente a cepa W2	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACT	Artemisinin based Combination Therapy
CAT	Catalase
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CQR	Cloroquina-resistentes
CSP	Proteína circunsporozoíta de <i>P. falciparum</i>
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
DMSO	Dimetilsulfóxido
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FUNASA	Fundação Nacional de Saúde
IPA	Índice parasitário anual
IS	Índice de seletividade
LABMAT	Laboratório de Biologia da Malária e Toxoplasmose
MTT	3-(4,5 dimetiltiazol-2il)-2,5 difeniltretazólico
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana de Saúde
PCNM	Programa Nacional de Controle da Malária
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PFDHFR	dihidrofolato redutase-timidilato sintase de <i>P. falciparum</i>
PFDHPS	dihidropteroato sintetase de <i>P. falciparum</i>
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
UFRN	Universidade Federal do Rio Grande do Norte
UFRPE	Universidade Federal Rural de Pernambuco
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REFERENCIAL TEÓRICO CONCEITUAL	13
2.1	Histórico	13
2.1.1	Malária no mundo.....	13
2.1.2	Malária no Brasil	14
2.1.3	Epidemiologia da malária.....	15
2.2	Biologia do <i>Plasmodium</i>	19
2.2.1	Ciclo de vida.....	20
2.3	Sintomas e complicações	22
2.4	Diagnóstico	24
2.5	Medidas de Controle	25
2.6	Quimioterapia antimalárica e resistência	26
2.6.1	Resistência Terapêutica.....	30
2.6.2	Principais classes de antimaláricos.....	30
2.6.2.1	Quinolínicos.....	30
2.6.2.2	Antifolatos.....	31
2.6.2.3	Artemisinina.....	32
2.6.2.4	Naftoquinonas.....	33
2.7	Compostos 1,2,3 – triazólico	35
2.8	Hibridização molecular	36
2.9	Principais métodos de ensaio <i>in vitro</i> para pesquisa de novos Antimaláricos	37
2.9.1	Contagem de esquizonte com base em microscopia simples (Microtest)	38
2.9.2	Ensaio a base de radioisótopos.....	38
2.9.3	Ensaio baseado em enzima.....	39
2.9.4	Triagem de Alto rendimento.....	39
3	JUSTIFICATIVA	40
4	HIPÓTESE	41
5	PERGUNTA CONDUTORA	42
6	OBJETIVO	43

6.1	Objetivo geral	43
6.2	Objetivos específicos	43
7	PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS	44
7.1	Desenho do estudo	44
7.2	Síntese dos compostos 2- amino- 1,4- naftoquinonas com anel 1,2,3 triazólico	44
7.3	Testes <i>in vitro</i>	45
7.3.1	Cepas.....	45
7.3.1.1	Descongelamento das cepas.....	45
7.3.2	Antimalárico de referência e compostos teste.....	45
7.3.3	Cultivo <i>in vitro</i> das fases intra-eritrocitárias de <i>Plasmodium falciparum</i>	45
7.3.4	Sincronização do cultivo de <i>Plasmodium falciparum</i>	46
7.3.5	Ensaio anti-malárico <i>in vitro</i>	46
7.3.6	Ensaio de citotoxicidade.....	47
7.3.7	Teste de Hemólise.....	48
7.3.8	Determinação da concentração inibitória de 50% do crescimento dos parasitos (IC50) e da linhagem celular HepG2 (CC50).....	48
7.3.9	Índice de seletividade.....	48
7.4	Considerações éticas	49
7.5	Análise Estatística	49
8	RESULTADOS	50
8.1	Ensaio de Citotoxicidade	50
8.2	Ensaio de Hemólise	50
8.3	Ensaio antimalárico <i>in vitro</i>	52
9	DISCUSSÃO	54
10	CONCLUSÃO	59
	REFERÊNCIAS	60
	APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)	70
	ANEXO A – SÍNTESE DOS COMPOSTOS 2- AMINO- 1,4- NAFTOQUINONAS COM ANEL 1,2,3 TRIAZÓLICO	73

**ANEXO B - PARECER DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE
ÉTICA EM PESQUISA.....**

1 INTRODUÇÃO

A malária é uma doença infecciosa provocada por protozoários do filo Apicomplexa, família Plasmodiidae e do gênero *Plasmodium*. A transmissão natural da doença se dá pela picada da fêmea de mosquitos do gênero *Anopheles* infectados com o *Plasmodium*. É considerada uma das principais doenças infecciosas do mundo, sendo a 2ª principal causa de morte nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (GILSON, 2018). As espécies que habitualmente parasitam o homem são cinco: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* e mais recentemente *Plasmodium Knowlesi*, sendo o *P. falciparum* a espécie responsável pela forma mais grave da doença. No Brasil, somente os três primeiros estão presentes, sendo o *P. vivax* e o *P. falciparum* as espécies predominantes (SINGH; DANESHVAR, 2013; MILNER *et al.*, 2013).

Constitui um grave problema de saúde pública por sua gravidade clínica e pelo elevado potencial de disseminação em áreas com densidade vetorial que favoreça a transmissão. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) foi estimado 241 milhões de novos casos com 627 mil óbitos durante o ano de 2020. O *P. vivax* é a espécie com maior distribuição geográfica e era tida como benigna, porém estudos demonstraram que a infecção pode progredir com resultados graves e fatais (GETHING *et al.*, 2012; BAIRD, J.K., 2014; DOUGLAS *et al.*, 2014; SIQUEIRA *et al.*, 2015). No Brasil a maioria dos casos se concentra na região Amazônica. Segundo o Ministério da Saúde foram registrados, nessa região, 109.449 casos de malária, entre janeiro e agosto de 2017, sendo 48% a mais do que o ano de 2016. A Organização PanAmericana de Saúde (OPAS, 2017), no entanto, chamou atenção para o possível reaparecimento da patologia em áreas nas quais a transmissão já havia sido interrompida.

O quadro clínico da Malária é variável, vai depender se o indivíduo é ou não proveniente de áreas endêmicas; da espécie de plasmódio infectante; do uso de medicação profilática, e; da resposta imune do hospedeiro, que envolve fatores genéticos. É caracterizado predominantemente por febre alta, acompanhada de calafrios, sudorese profusa e cefaléia, que ocorrem em padrões cíclicos, dependendo da espécie de *Plasmodium* infectante. No geral, o controle da doença depende quase exclusivamente de um programa integrado que inclui proteção

individual, impedindo ou reduzindo a possibilidade do contato homem-mosquito transmissor e, tratamento quimioterápico específico para os pacientes infectados (WHO, 2017).

A OMS deu início em 2019 a um programa-piloto para testar a primeira vacina contra a malária no mundo. Depois de 30 anos de estudos, a vacina Mosquirix™, chamada de RTS'S foi finalmente disponibilizada, em 3 países africanos, para crianças de até dois anos de idade, grupo de faixa etária mais vulnerável a doença. A RTS'S tem como alvo a proteína circunsporozoíta de *Plasmodium falciparum* (CSP), expressa nos estágios pré-eritrocíticos (CASARES; BRUMEANU; RICHIE, 2010). A vacina vem se demonstrando segura no programa e com isso em outubro de 2021 a OMS recomendou o uso da vacina entre crianças na África Subsaariana e em outras regiões com transmissão de moderada a alta da malária por *P. falciparum*. Porém a vacina ainda é restrita a crianças, sendo necessária uma extensão do programa-piloto para uma maior implementação e a futura adoção da vacina como parte das estratégias nacionais de controle da doença.

Assim, o tratamento medicamentoso ainda é a principal ferramenta para impedir a morbidade, o óbito e controlar a malária humana. O surgimento e a disseminação de parasitos resistentes a múltiplos antimaláricos, representam um dos principais agravantes no controle da doença no Brasil e no Mundo, estando associados ao aumento da morbidade e da mortalidade nas áreas endêmicas (WHO, 2014; SONKO et al., 2014). No Brasil, os parasitas vêm adquirindo resistência desde os anos 60, quando se tornaram tolerantes à cloroquina, ainda utilizada no tratamento do *Plasmodium vivax* (ROSENTHAL, 2001). O desenvolvimento de novos antimaláricos, eficazes e de baixo custo, representa uma das prioridades da OMS, afim de combater às cepas de *Plasmodium* resistentes à multidrogas (WHO, 2015).

As plantas podem ser usadas como modelos para projetos de compostos semi-sintéticos ou sintéticos, pois representam um extenso reservatório de fitoconstituintes e metabólicos secundários (THOMSON, 1991). Plantas contendo naftoquinonas são utilizadas pelas populações de diferentes localidades para tratamento de diversas doenças, incluindo doenças parasitárias e vários tipos de câncer. Naftoquinonas são metabólitos secundários produzidos por algas, fungos,

plantas e animais; e também podem ser sintetizados vários análogos e derivados (O'BRIEN, 1991). Algumas naftoquinonas naturais surgiram como propostas promissoras de pesquisa de química medicinal devido às suas propriedades estruturais. Elas atuam como elos vitais nas cadeias de transporte de elétrons das vias metabólicas e participam de múltiplos processos oxidativos biologicamente relevantes, levando ao estresse oxidativo e subsequentemente à morte do parasita (FARNERT, 2003).

Estruturas como o lapachol (derivado da naftoquinona) e uma 1,2-naftoquinona com heterociclo oxigenado foram bem estudadas em química medicinal como possíveis candidatos contra câncer e doenças parasitárias (GUIMARÃES *et al.*, 2013). A atovaquona é um derivado do lapachol sendo conhecido por sua aplicação no tratamento de casos leves de infecção por *Plasmodium vivax*, embora haja relatos de casos de resistência (YUAN-QIANG HU, 2017).

Estudos mostram que a naftoquinona triazólica (naftoquinona conjugada com o anel triazólico) tem potencial tripanocida e leishmanicida (DA SILVA, 2012). Países onde há espécies vegetais produtoras de naftoquinonas, como o Brasil, China e Japão, vêm contribuindo intensamente com os estudos químicos e farmacológicos dessas espécies (OLIVEIRA *et al.*, 1990; WU *et al.*, 1998; FERREIRA; SILVA; SOUZA, 2003; FONSECA; BRAGA; SANTANA, 2003; KARALAI *et al.*, 2010).

Diante disso, esse estudo avaliou através de testes *in vitro* cinco novos derivados sintéticos da 2-amino-1,4 naftoquinona conjugada com o anel 1,2,3 triazólico como possíveis candidatos a novos fármacos para a quimioterapia da malária.

2 REFERENCIAL TEÓRICO CONCEITUAL

2.1 Histórico

Dentre as protozooses mais conhecidas se destaca a malária, uma doença humana tão antiga quanto o próprio homem e que originou-se na África e está presente atualmente em praticamente todas as regiões tropicais e subtropicais do mundo. O termo malária é de origem italiana e, literalmente significa “mal ar”, pois acreditava-se que a doença fosse causada pelas emanações dos pântanos. Do francês, se origina o nome paludismo ou impaludismo, com igual significado. Esses termos foram universalizados e perduram até os dias atuais. Outras denominações, algumas mais populares são: maleita, sezão, febre palustre, batedeira e tremedeira (KOROLKOVAS; BURCKHALTER, 1982).

Dentre as doenças infecciosas a malária foi a que teve maior impacto na história mundial, influenciando no resultado das guerras, migrações, desenvolvimento e declínio de várias nações (VALE; MOREIRA; GOMES, 2005). Há várias referências na literatura antiga e das civilizações modernas que relatam febres malignas intermitentes e calafrios. Muitos representantes da história padeceram da febre maligna proveniente da malária, como o imperador do sacro império Romano Germânico Carlos V, que morreu de malária na Espanha em 1558. Santo Agostinho, o primeiro arcebispo de Canterbury, faleceu de uma doença que muito provavelmente era malária. Durante a Primeira Guerra Mundial, os exércitos foram debilitados pela malária, na campanha da Macedônia, e na Segunda Guerra, em algumas frentes, as baixas por essa parasitose foram maiores que as de combate (COSTA *et al.*, 2010).

2.1.1 Malária no Mundo

A Malária é uma das parasitoses humanas de maior distribuição geográfica. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 3,2 bilhões de pessoas (quase metade da população mundial) vivem em áreas consideradas malarígenas e nas Américas, considera-se que aproximadamente 128 milhões de pessoas vivem em áreas de risco de contrair a doença.

A malária originou-se no continente africano na pré-história, atingindo a Europa e Ásia com a migração do homem. No século XVI, a Malária chegou ao Novo Mundo pelas viagens de colonizadores espanhóis e portugueses. Na América do Norte ela foi uma das doenças mais debilitantes e disseminadas, impedindo significativamente o desenvolvimento das colônias norte-americanas por alguns anos (DUFFY, 1953).

Os ingleses introduziram na América duas espécies de agentes causadores da malária, *Plasmodium vivax* e *Plasmodium malariae*, quando fundaram Jamestown, na atual Virgínia, em 1607. Porém, foi a importação de escravos da África, a partir de 1620, que trouxe o *Plasmodium falciparum* para o continente (RUSSEL, 1968). Acredita-se que a decisão de transferir a capital sulista de Jamestown para Williamsburg, em 1699, foi motivada pelo desejo de escapar dos efeitos da malária. Com a expansão das colônias para o interior da América do Norte, a malária foi junto. Nos séculos XVIII e XIX, ela já era endêmica nas partes sudeste e oeste das colônias norte-americanas e a maior parte dos assentados naquelas regiões considerava inevitável contrair a doença (ACKERKNECHT, 1966).

2.1.2 Malária no Brasil

A febre malárica era retratada através de escritos médicos já no século XVI e desde então em toda a história médica brasileira, embora não existam, até o século XIX, registros quantitativos sobre a sua prevalência (MARTINS COSTA, 1885; PEIXOTO, 1917; BACELLAR, 1963).

No Brasil, a malária provavelmente surgiu devido ao intenso transporte marítimo com o Senegal. No início da década de 40 houve uma grande incidência da doença com cerca de 6 milhões de pessoas infectadas. Uma campanha nacional de erradicação baseada na pulverização de diclorodifeniltricloroetano (DDT) e tratamento dos casos febris com cloroquina foi lançada pelo governo nos anos 50, conforme recomendações da OMS (SILVA; HOCHMAN, 2011).

No fim do século XIX, a malária estava presente em todo o território nacional, particularmente na costa litorânea. A Amazônia e todo o planalto central viviam imersos na maleita. Apesar das estimativas indicarem 6 milhões de casos de malária por ano no início do século XX no Brasil, a situação da doença era estável, sem

notórios surtos epidêmicos. A malária estava presente em todas as capitais brasileiras, sendo endêmica em todo o país. Após a 2ª Grande Guerra a malária abandonou as capitais brasileiras e se refugiou na Amazônia (FAJARDO, 1904).

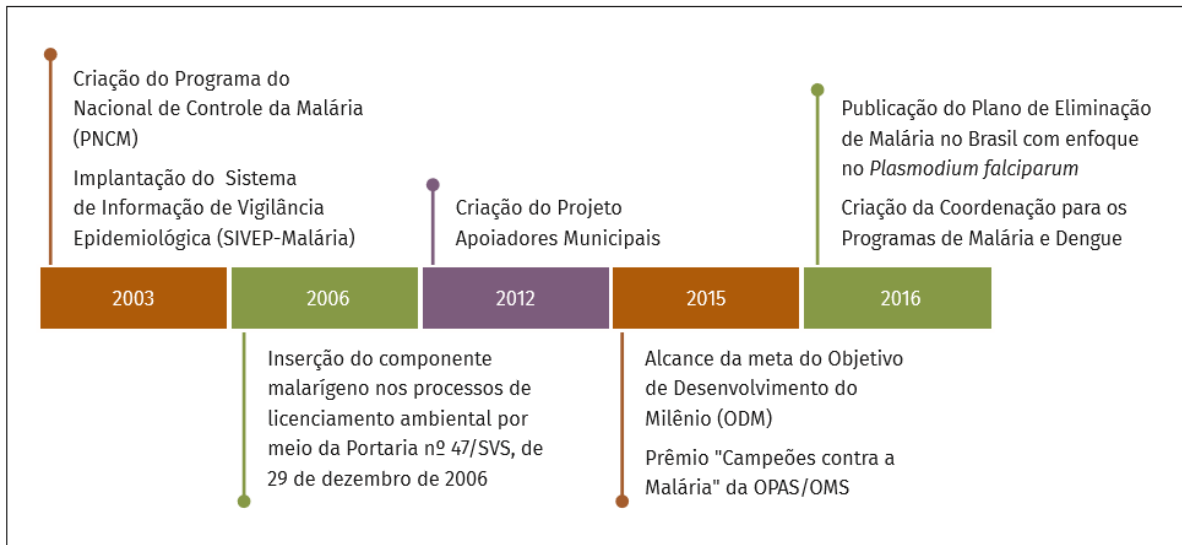
No Brasil, sob o comando inicial de Mário Pinotti e conduzida pelo Serviço de Combate à Malária, sucessor do Serviço de Combate à Febre Amarela, a campanha contra a doença atingiu o objetivo de controlar, mas não de erradicá-la. A malária sumiu das cidades e se refugiou em um paiol de pólvora na Amazônia, onde permanece intocada. Os 6 milhões de casos do início do século, viraram apenas 50 mil em 1970.

2.1.3 Epidemiologia da malária

Também chamada de maleita, impaludismo, paludismo, febre intermitente, a malária ainda é um problema de saúde pública em todo o mundo, sendo a causa de consideráveis perdas sociais e econômicas das populações sob risco (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019). Segundo a OMS, nas Américas, 42,5 milhões vivem em áreas de risco para a doença no Brasil, sendo a Região Amazônica responsável por cerca de 99% dos casos.

Em 2003, a Fundação Nacional de Saúde (Funasa) implantou o Programa Nacional de Controle da Malária (PNCM) no Brasil. Desde a sua implantação foram realizadas ações e estratégias voltadas ao controle e redução de casos, promovendo mudanças no cenário epidemiológico (Figura 1). Mesmo com a redução do número de casos da doença em virtude do programa de controle, a malária ainda acarreta muita preocupação uma vez que leva milhares de pessoas à óbito, principalmente nos países tropicais e nos países mais pobres da África. O PNCM tem como principais objetivos a redução do número de casos da malária, evitar óbitos e assegurar a ausência de transmissão onde essa já tenha sido interrompida e interromper a transmissão da doença nos locais onde ela ainda se faz presente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

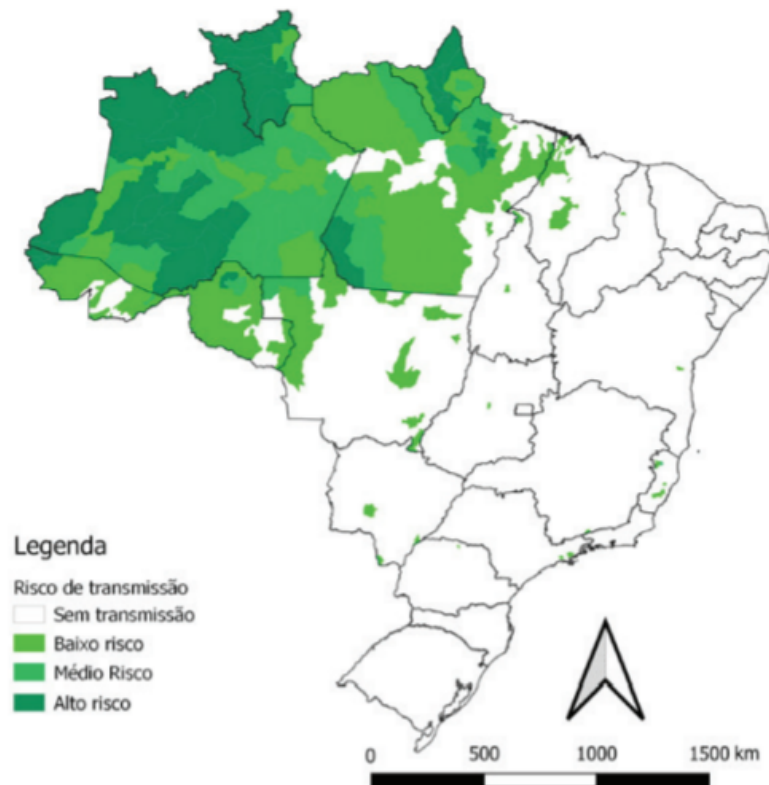
Figura 1- Linha do tempo do PCNM com as principais atividades realizadas de 2003-2016.



Fonte: Ministério da Saúde, 2019.

O Índice parasitário anual da malária (IPA) consiste no número de exames positivos da doença por mil habitantes, em determinado espaço geográfico, no ano considerado. A positividade resulta da comprovação da presença do parasita na corrente sanguínea do indivíduo infectado, por meio de exames laboratoriais específicos. O IPA estima o risco de ocorrência de malária, numa determinada população em intervalo de tempo determinado e está relacionado à exposição de indivíduos à picada de fêmeas de mosquitos do gênero *Anopheles* infectadas pelo protozoário do gênero *Plasmodium*. Ele é classificado como baixo (0,1 a 9,9 casos por 1.000 hab.), médio (10,0 a 49,9/1.000 hab.) e alto (maior ou igual a 50,0/1.000 hab.) No Brasil, as áreas endêmicas localizam-se na região chamada de Amazônia Legal, compreendendo os estados do Acre, Amapá, Amazonas, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins e Maranhão (Figura 2).

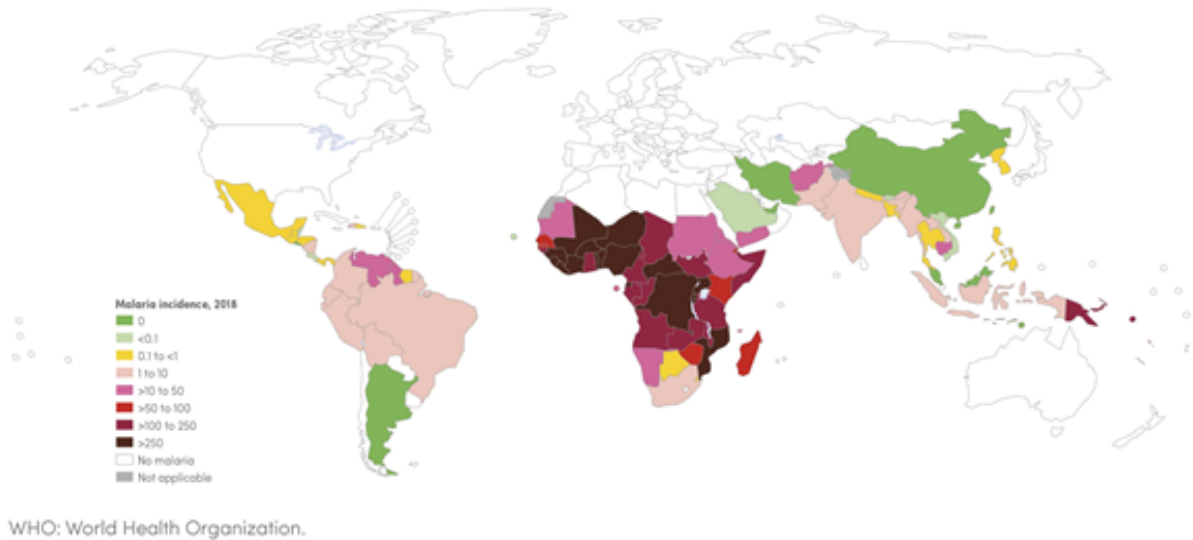
Figura 2- Mapa do Brasil que destaca as áreas de risco para malária, de acordo com os diferentes níveis de incidência parasitária anual (IPA), em 2018.



Fonte: Ministério da Saúde. Guia Prático de tratamento da malária no Brasil. 2019.

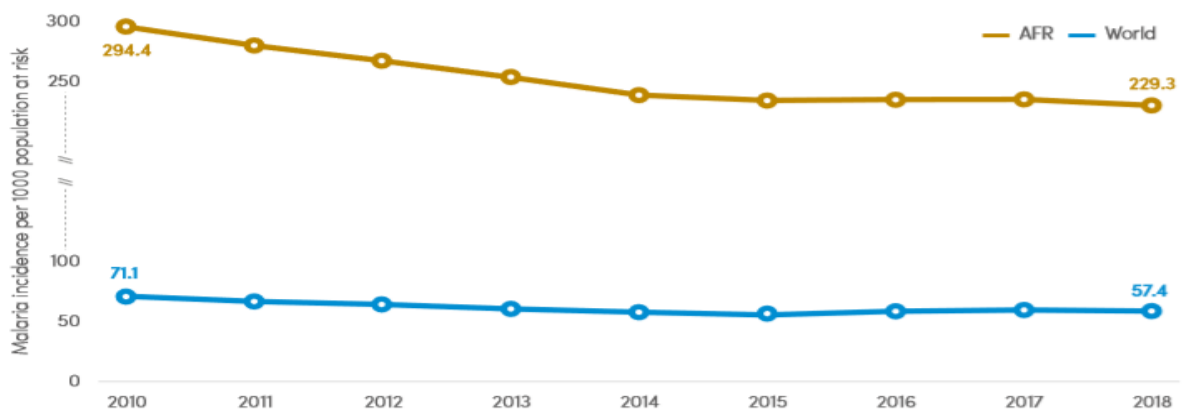
O Índice Parasitário Anual da malária (Figura 3) no mundo caiu de 71 em 2010 para 57 em 2018. No entanto, de 2014 a 2018, a taxa diminuiu, reduzindo de 60 em 2013 para 57 em 2014 e permanecendo em níveis semelhantes até 2018. Na Região Africana da OMS, os níveis de incidência de casos diminuíram de 294 em 2010 para 229 em 2018, representando uma redução de 22% na incidência (Figura 4).

Figura 3- Mapa da taxa de incidência de casos de malária (casos por 1.000 habitantes em risco) por país, 2018.



Fonte: Boletim Epidemiológico. WHO, 2019.

Figura 4- Tendências da taxa de incidência de casos de malária (casos por 1.000 habitantes em risco) globalmente e por região da OMS, 2010–2018.



Fonte: Boletim Epidemiológico. WHO, 2019.

Segundo o Ministério da saúde, no Brasil de janeiro a março de 2019 foram registrados 31.872 casos novos da doença, onde em 2018 no mesmo período foram registrados 51.076 novos casos, demonstrando que houve uma redução de 38% de casos da doença. A região Amazônica é responsável por mais de 90% dos casos da doença no país, porém é de extrema importância a vigilância da doença na região

extra-amazônica pois segundo dados da Secretaria de Vigilância em saúde (SVS) do Ministério da Saúde a letalidade da doença nessa região é 80 vezes maior. Tendo em vista que fora da área endêmica os sintomas podem ser confundidos com outras doenças febris o diagnóstico e o tratamento se tornam tardios.

A Amazônia brasileira não é homogênea no que se refere à distribuição da malária, havendo áreas de alta, média e baixa transmissão, bem como regiões nas quais a moléstia não é transmitida (DE SOUZA *et al.*, 1997). Segundo o Ministério da Saúde, o *P. vivax* é a espécie responsável por cerca de 90% dos casos (WHO, 2010). No entanto, a forma grave e letal da doença é causada pela infecção por *P. falciparum* (BRASIL, 2019).

Os estados de São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e Espírito Santo são os que apresentam maior número de notificações de malária fora da região amazônica. Quando se observa os casos autóctones, os estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo são os que apresentam maior número de casos notificados, sendo as regiões serranas dos dois estados os locais que apresentam maior risco de transmissão da doença. O município do Conde, na região metropolitana da Paraíba, se destacou no cenário da malária com um total de 20 casos no ano de 2019. De janeiro a outubro de 2017, foram notificados 499 casos de malária extra-amazônica (BRASIL, 2015). Apesar de representar apenas 3% do total de casos notificados no Brasil nesse período, esse número chama atenção uma vez que a letalidade da malária na região extra-amazônica é cerca de 80 vezes maior do que na Amazônia (COSTA *et al.*, 2010).

2.2 Biologia do *Plasmodium*

Em 1880, Charles A. Laveran, um oficial médico do exército francês da época, identificou pela primeira vez o parasita da malária em glóbulos vermelhos humanos, além de descobrir as quatro formas do parasita: anel, trofozoíto, esquizonte e gametócito (STANLEY *et al.*, 1991). Seis anos depois, Camilo Golgi descobriu o desenvolvimento assexuado do parasita e mostrou que o início da febre coincidia com a ruptura das hemácias e a liberação dos parasitas. Em 20 de agosto de 1897 Ronald Ross tornou possível a identificação do ciclo de vida do parasita.

O gênero *Plasmodium* pertence ao filo Apicomplexa, caracterizado por exibir vesículas subpelículas achatadas e um complexo apical, composto de um ou mais

anéis polares, roptrias, micronemas, conóide de microtúbulos subpeliculares em um estágio do ciclo de vida que tem um papel central na invasão das células hospedeiras (ADL *et al.*, 2005;2012).

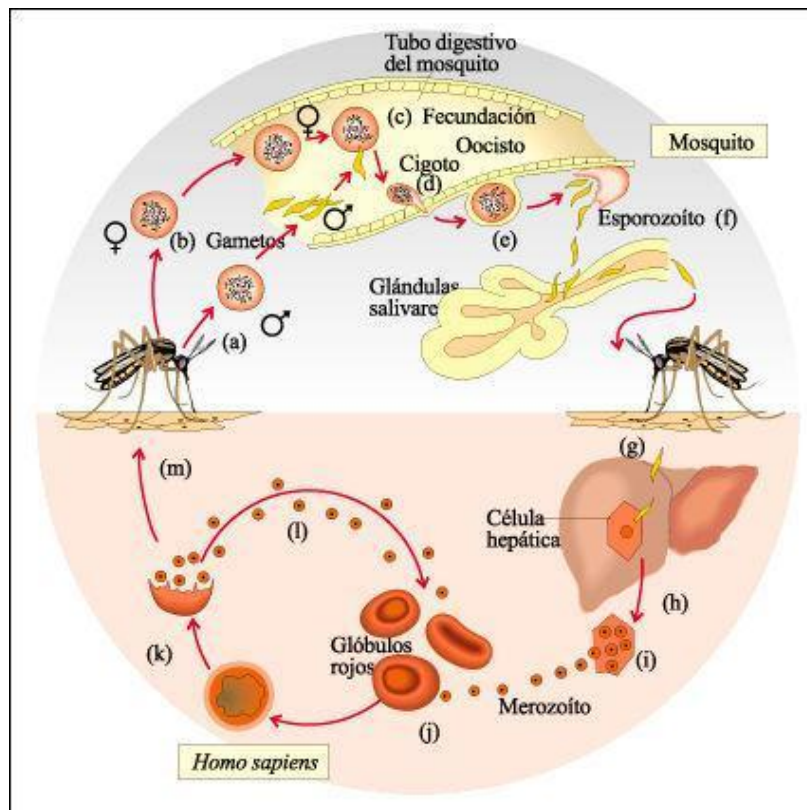
Apesar de mais de cem espécies deste gênero, somente *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. knowlesi* infectam o homem, sendo as 3 primeiras espécies encontradas no Brasil (BRASIL, 2014; PINA-COSTA *et al.*, 2014; WHO, 2014). *P. falciparum* é o mais patogênico, produz uma febre terçã (ciclo de 48 horas) maligna e causa a morte se não diagnosticado e tratado precocemente, principalmente em pessoas em sua primeira infecção. Por outro lado, *P. vivax*, que é o agente da febre terçã benigna, raramente produz infecções fatais, mas tem uma ampla distribuição mundial. *P. ovale* é responsável por outra forma de febre terçã benigna, mas está restrito ao continente africano. *P. malariae* causa febre quartã (ciclo de 72 horas) e, apesar de ser encontrado no mundo todo, apresenta uma distribuição muito pontual. O *P. knowlesi* apresenta acessos febris a cada 24 horas.

O vetor, hospedeiro invertebrado, faz parte do gênero *Anopheles* e da família *Culicidae*, sendo popularmente chamado de mosquito-prego no Brasil. O gênero está dividido em torno de 400 espécies, das quais cerca de 70 têm a capacidade de transmitir o protozoário da malária aos humanos e cerca de 40 são capazes de transmitir a doença a um nível de grande preocupação para a saúde pública (BECKER *et al.*, 2010; SINKA *et al.*, 2012; WHITE *et al.*, 2014). No Brasil, as principais espécies encontradas são a *A. darlingi*, *A. aquasalis*, *A. albitarsis*, *A. cruzii* e *A. bellator*, sendo o *A. darlingi* o principal vetor, com ampla distribuição geográfica (WHO, 2014).

2.2.1 Ciclo de vida

O ciclo de vida do *Plasmodium* envolve um hospedeiro humano, responsável pela fase assexuada, e um mosquito, responsável pela fase sexuada do ciclo (hospedeiro definitivo), sendo portanto classificado como heteroxênico (WHITE *et al.*, 2014) (Figura 5).

Figura 5- Ciclo de vida do *Plasmodium*, agente causador da malária.



Fonte: Modificado de <http://www.OMS.int/tdr/diseases/paludismo/lifecycle.htm>

A fêmea do mosquito do gênero *Anopheles* ingere os gametócitos quando pica o homem doente. Tais formas, no tubo digestivo, se transformam em gametas. Os gametas dão origem ao oocineto (zigoto) por meio da reprodução sexuada. Essas formas penetram a parede do tubo digestivo do hospedeiro invertebrado, transformando-se em oocistos que, por aumento progressivo de tamanho e divisão (esporogonia), produzem numerosos esporozoítos, que ganham a cavidade celômica e atingem as glândulas salivares sendo inoculados pela saliva do inseto durante a picada, esse ciclo tem duração, em média, de 7 a 21 dias (AMINO *et al.*, 2006; GUEIRARD *et al.*, 2010; SILVIE *et al.*, 2007).

Durante o repasto sanguíneo a fêmea do mosquito inocula esporozoítos no tecido subcutâneo. Em um curto intervalo de tempo, os esporozoítos se direcionam para o fígado, passam através das células de Kuppfer, invadem as células hepáticas e iniciam a esquizogonia, que se divide em duas fases, a fase hepática (esquizogonia pré-eritrocítica) e a fase eritrocítica (esquizogonia eritrocítica).

Dentro dos hepatócitos, os trofozoítos iniciam sua divisão intracelular assexuada. Ao fim desta fase, milhares de merozoítos exoeritrocíticos são liberados

de cada hepatócito infectado. O tempo gasto para que seja completada a fase tecidual varia de acordo com a espécie infecciosa: 8 a 25 dias para *Plasmodium falciparum*, 8 a 27 dias para *P. vivax*, 9 a 17 dias para *P. ovale*, 15 a 30 dias para *P. malariae* e 9 a 12 dias para *P. knowlesi* (NG OT *et al.*, 2008). No caso de *P. vivax* e *P. ovale*, alguns esporozoítos podem entrar em estágio de dormência, também conhecido como criptobiótico, quando são chamados de hipnozoítos. Eles podem permanecer latentes por meses ou anos e, quando reativados, levam a novas manifestações clínicas denominadas recaídas.

Os merozoítos liberados pelos hepatócitos interagem com os eritrócitos e os invadem dando início ao ciclo intraeritrocítico. Durante essa fase, os merozoítos desenvolvem a esquizogonia sanguínea, primeiramente como trofozoíto evoluindo para esquizonte ou merócitos. Após o rompimento das hemácias há liberação dos merozoítos na corrente sanguínea que por sua vez irão invadir novas hemácias reiniciando o ciclo. Geralmente nessa fase são observados os “acessos febris”, considerado um dos principais sintomas da doença (TARUN *et al.*, 2006).

Após diversos ciclos de replicação, os merozoítos eritrocíticos se desenvolvem em formas sexuadas, que são os gametócitos femininos e masculinos. Em infecções por *P. falciparum*, eles são formados mais tardiamente se comparado ao *P. vivax* (BRUCE-CHWATT, 1985; PHIMPRAPHI *et al.*, 2008). Os gametócitos são captados pela fêmea do mosquito vetor durante o repasto sanguíneo. Já dentro de seu estômago os gametócitos masculinos sofrem exflagelação e se fundem com o gameta feminino formando o zigoto que dará origem ao oocineto, que se aloja na parede intestinal do mosquito formando o oocisto, dando início novamente a todo o ciclo.

2.3 Sintomas e Complicações

Os sintomas da malária são: febre alta, calafrios, cefaleia, vômito, anorexia, fadiga, diarreia e anemia. Se não tratados adequadamente e em tempo hábil podem desencadear complicações graves como edema pulmonar, complicações renais, icterícia e obstrução de vasos sanguíneos no cérebro (malária grave), o que pode levar a morte do indivíduo (CAMARGO, 2003). Pela inespecificidade dos sinais e sintomas provocados pelo *Plasmodium*, o diagnóstico clínico da malária não é preciso, principalmente em regiões onde a doença não é endêmica. Doenças febris

agudas como a dengue, febre amarela leptospirose, febre tifoide e muitas outras, podem apresentar sinais e sintomas semelhantes a malária e portanto a decisão de tratar um paciente por malária deve se basear na confirmação laboratorial da doença, pela microscopia da gota espessa de sangue ou por testes imunocromatográficos (BRASIL, 2010).

A malária grave é causada pela infecção pelo *Plasmodium falciparum*, apesar de existirem relatos cada vez mais frequentes de infecções graves pelo *Plasmodium vivax* (TJITRA *et al.*, 2008). Devido à menor duração do seu ciclo tecidual, à maior produção de merozoítas durante as esquizogonias tecidual e eritrocitária e a capacidade de infectar hemácias de qualquer idade, o *P. falciparum* tem a potencialidade de produzir hiperparasitemias, intimamente relacionada à gravidade da infecção (MUTIS, 2005). Além disso, o *P. falciparum* é a única espécie que claramente produz alterações na microcirculação, concorrendo assim para o surgimento de uma doença mais grave (GOMES, 2000).

As altas parasitemias provocadas pelo *P. falciparum* (maiores ou iguais a 5% de hemácias infectadas) estão intimamente relacionadas com a gravidade do quadro clínico da doença, tanto pelo maior acometimento da microcirculação, quanto pela presença de efeitos metabólicos deletérios, como a hipoglicemia e a acidose láctica (MOHANTY, 2003).

Para o diagnóstico da malária grave, algumas características clínicas e laboratoriais devem ser observadas atentamente (Tabela 1). Se presentes, conduzir o paciente para o tratamento da malária grave, que se baseia na utilização de antimaláricos potentes e de ação rápida como a combinação de Artesunato/ Artemether/ Quinina com Clindamicina (Não indicado para gestantes no 1º trimestre).

Tabela 1: Manifestações clínicas e laboratoriais indicativas da malária grave e complicada.

MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Dor abdominal intensa (ruptura de baço, mais frequente em <i>P. vivax</i>) ▪ Mucosas amareladas, icterícia (não confundir com mucosas hipocoradas) ▪ Mucosas muito hipocoradas (avaliada fora do ataque paroxístico febril) ▪ Redução do volume de urina a menos de 400mL em 24 horas ▪ Vômitos persistentes que impeçam a tomada da medicação por via oral ▪ Qualquer tipo de sangramento ▪ Falta de ar (avaliado fora do ataque paroxístico febril) ▪ Extremidades azuladas (cianose) ▪ Aumento da frequência cardíaca (avaliar fora do acesso malárico) ▪ Convulsão ou desorientação (não confundir com o ataque paroxístico febril) ▪ Prostração (em crianças) ▪ Comorbidades descompensadas
MANIFESTAÇÕES LABORATORIAIS
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Anemia grave ▪ Hipoglicemia ▪ Acidose metabólica ▪ Insuficiência renal ▪ Hiperlactatemia ▪ Hiperparasitemia (> 250.000/mm³ para <i>P. falciparum</i>)

Fonte: Organização Mundial da Saúde, 2019.

2.4 Diagnóstico

A microscopia da gota espessa de sangue, colhida por punção digital e corada pelo método de walker ou de Giemsa é considerada o padrão-ouro para a detecção e identificação dos parasitos da malária. É possível detectar densidades baixas de parasitos (5-10 parasitos por μl de sangue), quando o exame é feito por profissional experiente. Contudo, nas condições de campo, a capacidade de detecção é de 100 parasitos/ μl de sangue (BRASIL, 2016). Um outro tipo de visualização microscópica do parasita é por meio da distensão sanguínea, que permite a identificação da espécie, mas apresenta uma menor sensibilidade (BRASIL, 2005).

Além da hematoscopia, existem outros métodos que vêm sendo desenvolvidos para o estabelecimento do diagnóstico de malária e que se baseiam na detecção de antígenos dos parasitos por anticorpos monoclonais, que são revelados por método imunocromatográfico. Comercialmente estão disponíveis em

“kits” que permitem diagnósticos rápidos, em cerca de 15 a 20 minutos. Porém apresentam algumas desvantagens como a não distinção entre o *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale*, além de não medir o nível de parasitemia (BRASIL, 2016).

Nos últimos anos, vários estudos têm utilizado a reação de polimerização em cadeia (PCR) como método de detecção de DNA de *Plasmodium* circulante (Contudo, devido ao elevado custo da técnica, a mesma não é utilizada como rotina para diagnóstico de casos, permanecendo restrita a centros de pesquisa (SPEERS *et al.*, 2003; ANDRADE *et al.*, 2010).

2.5 Medidas de controle

Com o aumento desenfreado do número de casos da doença em várias partes do mundo a Organização Mundial da Saúde propôs já no início da década de 70 a transformação dos programas de erradicação em programas de controle (OMS, 1971).

O diagnóstico precoce e o tratamento imediato e adequado dos casos da doença, especialmente os casos mais graves, constituem ações relevantes no controle da malária (BRASIL, 2006). O controle do vetor também é de extrema importância e deve ser feito de forma ajustada à realidade entomo-epidemiológica, de modo a garantir a redução da prevalência e interrupção da transmissão (BRASIL, 2006).

No Brasil, para o desenvolvimento das ações de controle da doença deve-se levar em consideração duas condutas: A conduta em relação a doença e a conduta em relação ao vetor. Em relação a doença, deve-se ter meios para a realização do diagnóstico precoce e tratamento imediato e adequado, uma vez que esse procedimento garante a prevenção de óbito por malária, a redução do aparecimento de casos graves, a redução de fonte de infecção e a diminuição da transmissão, mantendo a doença em níveis socialmente suportáveis. Em relação ao vetor devem ser tomadas medidas antivetoriais orientadas para cada área específica, com baixo custo e viáveis, para que se possa obter uma significativa redução da densidade de anofelinos de uma determinada área (MARQUES, A. C., 1997).

2.6 Quimioterapia – Opções atuais de tratamento

O tratamento da malária é complexo, longo e deve ser iniciado em tempo oportuno (até 48 horas do aparecimento dos sintomas), afim de prevenir o desencadeamento das formas graves da doença, bem como reduzir a mortalidade, além de eliminar a fonte de infecção para o mosquito, e, conseqüentemente, reduzir a transmissão da doença. Em vários países, incluindo o Brasil, a quimioterapia da malária é feita empregando-se uma combinação de derivados quinolínicos e artemisinínicos como tratamento padrão em casos não complicados partindo da evidência de resistência aos fármacos quinolínicos atuais em monoterapia (BALINT, 2001; MILLER, *et al.*, 2013).

A quimioterapia da malária visa atingir o parasito em pontos específicos do seu ciclo evolutivo, que podem ser didaticamente resumida em: interrupção da esquizogonia sanguínea, responsável pela patogenia e manifestações clínicas da infecção; destruição de formas latentes do parasito no ciclo tecidual (hipnozoítos) das espécies *P. vivax* e *P. ovale*, evitando assim as recaídas; e interrupção da transmissão do parasito, pelo uso de drogas que impedem o desenvolvimento de formas sexuadas dos parasitos (gametócitos) (BRASIL, 2019).

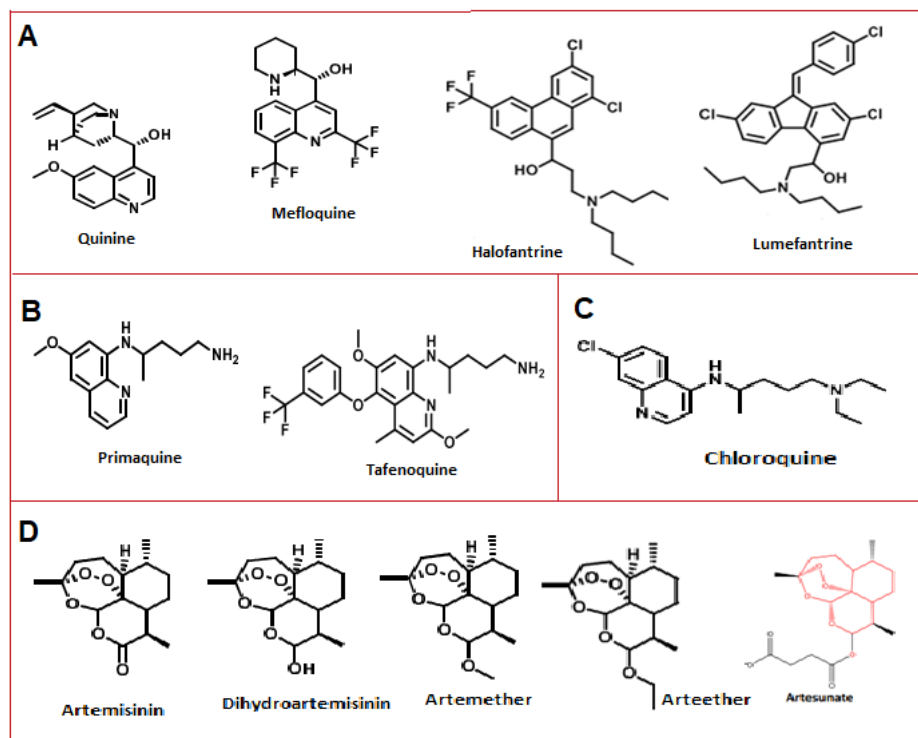
Das espécies de *Plasmodium* que afetam o ser humano, apenas o *P. vivax* e o *P. ovale* apresentam hipnozoítos, a forma do parasito que se mantém dormente no fígado, e é responsável pelas recaídas. O objetivo do tratamento da malária ocasionada por essas espécies de *Plasmodium* é, portanto, curar tanto a forma sanguínea quanto a forma hepática (cura radical) (BOULOS, M. *et al.*, 1991). Para isso usa-se a combinação de dois medicamentos: cloroquina e primaquina. Apenas as 8-aminoquiloninas têm atividade contra os hipnozoítos (primaquina é a única desta classe atualmente em uso em todo o Brasil) (SILVINO, A.C.R. *et al.*, 2016).

O tratamento de *P. malariae* assemelha-se ao tratamento para malária *vivax* (apenas cloroquina por 3 dias), contudo sem a necessidade do uso da primaquina. Em relação ao tratamento de *P. falciparum*, a OMS recomenda uma terapia combinada com algum derivado de artemisinina (ACT). A eficácia e segurança de artesunato/mefloquina e artemeter/lumefantrina são bastante semelhantes e o uso de uma associação ou outra deve ser feito conforme a

disponibilidade local (PEIXOTO; MARCHESINI; DE OLIVEIRA, 2016; FREY *et al.*, 2010). Para pacientes com infecção mista por *P. falciparum* e *P. vivax* (ou *P. ovale*), o tratamento deve incluir artemerter/lumefantrina ou artesunato/mefloquina, que são drogas esquizonticidas sanguíneas eficazes para todas as espécies, associando-as à primaquina por 7 dias (para o tratamento radical de *P. vivax*) (BRASIL, 2019).

Os antimaláricos são divididos em classes de acordo com sua estrutura química, mecanismo de ação e o alvo no hospedeiro humano. Quanto a estrutura química, as drogas antimaláricas podem ser classificadas em: Aril-aminoalcoois, 4- aminoquinolinas, 8-aminoquinolinas, Artemisininas, Antifolatos, Antimicrobianos e Inibidores da cadeia respiratória (Figura 6). Quanto ao alvo de ação no ciclo biológico do parasito os antimaláricos podem ser classificados em: esquizonticidas teciduais ou hipnozoiticidas (cura radical do *P. vivax*), esquizonticidas sanguíneos (promovem a cura clínica), gametocidas (bloqueiam a transmissão) e esporonticidas (impedem a infecção pelos esporozoítos).

Figura 6- Estrutura química dos principais Antimaláricos

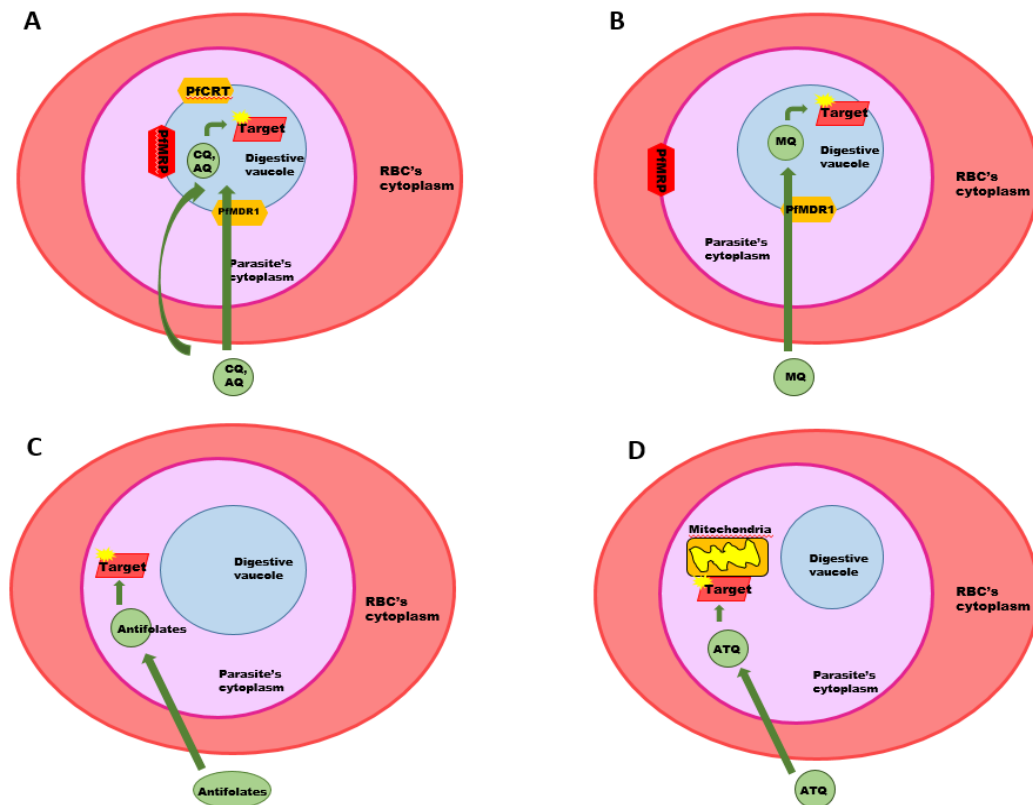


Legenda: Estruturas químicas dos principais antimaláricos: A) aril-aminoalcoois, B) 8-aminoquinolinas, C) 4- aminoquinolinas e D) Artemisininas.

Fonte: Adaptado de ARROW *et al.*, 2014 e Jourdan *et al.*, 2018

Os fármacos antimaláricos têm um modo de ação e mecanismo diferentes dentro do parasita, como exemplificado na figura 7. As 4-aminoquinolonas, como a cloroquina e a amodiaquina, e os derivados de aminoálcool, como a mefloquina e a quinina se ligam à molécula de β -hematina e inibe a via de desintoxicação do heme o vacúolo digestivo do parasita. Os derivados antifolatos têm como alvo o gene bifuncional de dihidropteroato sintetase (Pfdhps) e o gene dihidrofolato redutase-timidilato-sintase de *Plasmodium falciparum* (Pfdhfr) envolvido na biossíntese do folato no citoplasma do parasita. A Atovaquona, uma naftoquinona utilizada como profilático, se liga ao citocromo b e interfere no mecanismo de transporte de elétrons nas mitocôndrias do parasita, promovendo o colapso do potencial de membrana mitocondrial do parasito (SRIVASTAVA *et al.*, 1997). Assim como outras naftoquinonas, em concentrações 100 vezes menores que a necessária para inibir o complexo Bc1 de mamíferos, a atovaquona inibe o transporte de elétrons no nível do complexo citocromo bc1 de *Plasmodium falciparum*. Com o sucesso da atovaquona, a cadeia transportadora de elétrons do parasito foi validada como alvo terapêutico da malária (FRY; PUDNEY, 1992).

Figura 7- Mecanismo de ação dos antimaláricos.



Legenda: Modelo proposto para o mecanismo e localização alvo dos fármacos antimaláricos. (a e b) As 4-aminoquinolonas, como a cloroquina e a amodiaquina, e os derivados de aminoálcool, como a mefloquina e a quinina se ligam à molécula de β -hematina e inibe a via de desintoxicação do heme o vacúolo digestivo do parasita. (c) Os derivados antifolatos têm como alvo o gene bifuncional de dihidrofolato redutase-timidilato sintase de *Phdhps* e *Plasmodium falciparum* envolvido na biossíntese de folato no citoplasma do parasita. (d) A atovaquona se liga ao citocromo b e interfere o mecanismo de transporte de elétrons nas mitocôndrias do parasita.
 Fonte: Adaptado de HIASINDH; SUBHASH, 2016.

Dependendo da espécie do plasmódio causador da doença, da ocorrência de resistência na área de transmissão, da gravidade do quadro clínico e da idade do paciente, há drogas primariamente indicadas para cada caso, e, portanto, seu uso poderá variar em função do conhecimento do profissional de saúde e da disponibilidade dos medicamentos antimaláricos no local de atendimento (BALINT, 2001; MILLER *et al.*, 2013).

2.6.1 Resistência terapêutica

A resistência aos antimaláricos é definida pela OMS como “a capacidade que um parasita possui, para sobreviver e se multiplicar na presença de concentrações de fármaco que normalmente destruiriam parasitas da mesma espécie ou preveniriam a sua multiplicação” (WHO, 1963). A resistência as drogas antimaláricas atualmente utilizadas pode depender de vários fatores, tais como a administração inadequada de fármacos, propriedades intrínsecas ao composto utilizado, nível de imunidade do hospedeiro (CRAVO *et al.*, 2001), farmacogenética e má nutrição (WHITE, 1999; HESS *et al.*, 1997). A nível do parasita ela surge quando um ou mais indivíduos constituintes de uma população parasitária possuem uma ou mais mutações que lhe proporcionam uma vantagem seletiva na presença de concentrações de fármaco que em condições normais inibiriam a proliferação da fracção sensível da população parasitária (PETERS, 1990).

O tratamento combinado com artemisinina cura a maioria dos pacientes porém segundo a OMS, nos últimos anos foram detectadas resistências em cinco países da sub-região Grande Mekong: Camboja, República Democrática Popular Lao, Myanmar, Tailândia e Vietnã. Estudos confirmaram que a resistência à artemisinina emergiu independentemente em diversas áreas dessa sub-região.

O *P.falciparum* apresenta resistência em todos os antimaláricos atualmente utilizados (amodiaquina, cloroquina, mefloquina, quinina, sulfadoxina-pirimetamina e derivados de artemisinina) e não há relatos de introdução de novos antimaláricos na prática clínica desde 1980, quando ocorreu o emprego da artemisinina e seus derivados (AGUIAR *et al.*, 2012).

2.6.2 Principais classes de Antimaláricos

2.6.2.1 Quinolínicos

No século XVII populações indígenas da América do Sul utilizavam chás e bebidas preparadas com a casca de uma árvore nativa do Peru para o

tratamento de alguns tipos de febre. Somente em 1742, essa árvore recebeu o nome científico de Cinchona (LEE,2002).

Em 1820, Pierre Pelletier e Joseph Caventau através do isolamento de alcaloides ativos da casca da Cinchona provaram que a Quinina era o seu principal componente ativo. No ano seguinte a Quinina começou a ser comercializada no mundo todo, sendo conhecida como “pó dos jesuítas”.

A cloroquina foi sintetizada por Alemães na década de 1930 e durante anos foi utilizada como monoterapia e profilaxia em diversos países, devido ao seu baixo custo, ser bem tolerada e ser segura para o tratamento de mulheres grávidas e não apresentar efeitos tóxicos nas dosagens recomendadas, além de ser eficaz na cura da doença (SILVA *et al.*, 2005; ROBERT *et al.*, 2001).

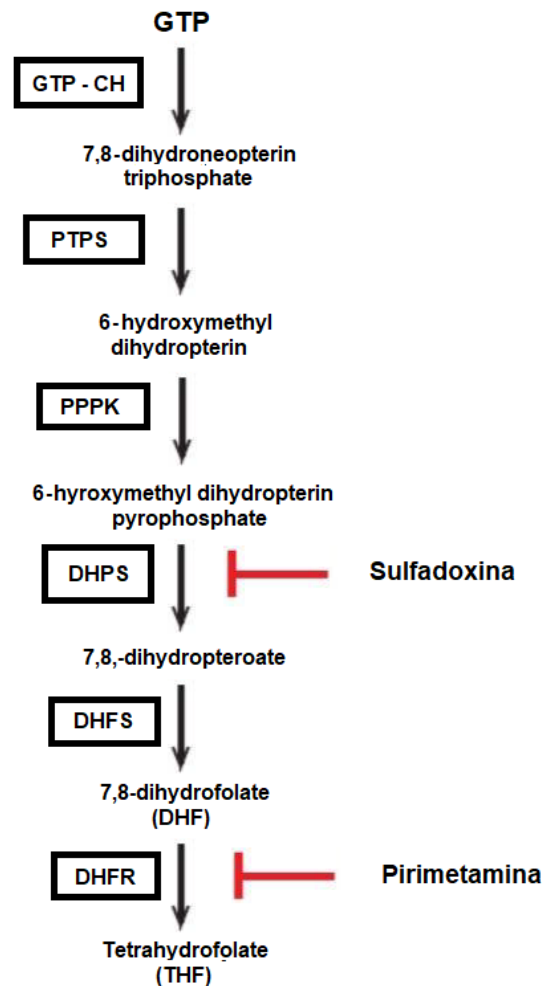
Em poucos anos surgiram os primeiros relatos de resistência à cloroquina, inicialmente na Tailândia, em 1957, e posteriormente na fronteira da Colômbia e Venezuela, em 1959 (WERNSDORFER, 1991). Com o surgimento de cepas cloroquina-resistentes (CQR), foram sintetizados novos antimaláricos derivados da cloroquina como, por exemplo, a amodiaquina e a mefloquina as quais possuem a mesma ação esquizotóxica da cloroquina (KROGSTAD *et al.*, 1992).

2.6.2.2 Antifolatos

O ácido fólico é muito importante para o metabolismo do parasita; enquanto o homem obtém essa vitamina através da sua alimentação, os protozoários podem sintetizá-las (WILSON, 2008). Esta classe de antimaláricos é formada por compostos que são responsáveis pela inibição das enzimas da via do folato, o que reduz a síntese de bases pirimídicas e, conseqüentemente, a produção de DNA (OLLIARO, 2001).

Com o surgimento da resistência a quinina, a sulfadoxina e a pirimetamina passaram a ser usadas em associação (SP; Fansidar™), ambas atuantes na biossíntese do folato, porém inibindo enzimas diferentes da via. A droga pirimetamina afeta a atividade da enzima diidrofolato redutase de *P. falciparum* (pfdhfr), enquanto a sulfadoxina impede a atividade da diidropteroato sintetase (pfdhps) (Figura 8) (SEVERINI; MENEGON, 2015).

Figura 8- Síntese do Ácido Fólico



Fonte: ANDRADE *et al*, 2013.

2.6.2.3 Artemisinina e seus derivados

Na tentativa de evitar a resistência e melhorar os resultados do tratamento, a OMS preconiza como tratamento de primeira escolha para a malária não complicada por *P. falciparum* a Artemisinin based Combination Therapy (ACT).

A artemisinina é um produto natural extraído de uma erva medicinal chinesa a *Artemisia annua* ou Qing Hao e foi isolada pela primeira vez na década de 70 (WRIGHT, 2005). O composto destaca-se dos demais antimaláricos por não apresentar um anel heterocíclico com nitrogênio (KLAYMAN, 1985). A partir dela já foram sintetizadas várias análogos com variadas atividades farmacocinéticas como o artesunato de sódio, a diidroartemisinina, o arte éter e o artemeter. Esses compostos

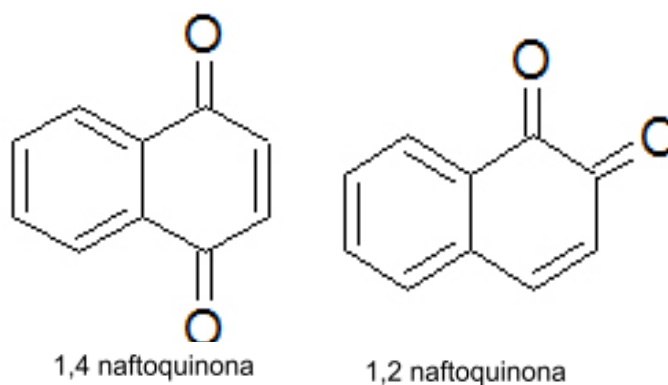
são esquizotóxicas e gametocidas, o que limita a transmissão para outros hospedeiros.

O mecanismo de ação desses compostos ainda não está bem elucidado mas sabe-se que a ponte endoperóxido desses compostos, interage com o ferro proveniente da digestão da hemoglobina no vacúolo digestivo do parasita (GOLENSER *et al.*, 2006). Com isso, a maioria dos estudos sugerem que a artemisinina aumenta o estresse oxidativo no parasita e reduz os níveis de antioxidantes e glutatona (MESHNICK,2002; CUI & SU, 2009).

2.6.2.4 Naftoquinonas

As naftoquinonas são metabólitos secundários obtidos através de plantas, algas, fungos e animais. Correspondem a um grupo pertencente a uma classe importante de produtos naturais, as quinonas, que apresenta como anel aromático o anel naftalênico (SILVA; FERREIRA; DE SOUZA, 2003). Possuem dois grupos carbonílicos que quando dispostos nas posições 1,2 do anel naftaleno são chamadas de orto-naftoquinonas e quando nas posições 1,4 de para-naftoquinonas (Figura 9). Estes isômeros naftoquinônicos apresentam diferentes propriedades físicas e químicas, refletindo assim, em sua atuação biológica (SILVA; FERREIRA; SOUZA, 2003; BABULA *et al.*, 2009).

Figura 9- Estrutura química da orto e para-naftoquinona.

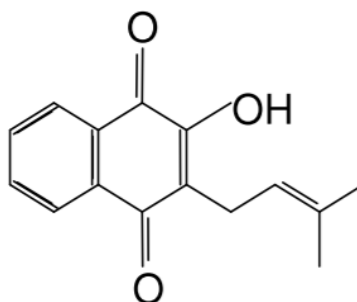


Fonte: Adaptado de ELIANE, et al 2016.

As naftoquinonas são substâncias que apresentam uma grande variedade de atividades biológicas, tais como: anticâncer (JARDIM *et al.*, 2015; KISHORE *et al.*, 2014; MALLAVADHANI *et al.*, 2014), antibacterianas, antifúngicas (IBIS *et al.*, 2013; RAHMOUN *et al.*, 2012), tripanocidas (PINTO; CASTRO, 2009), moluscidas (BARBOSA *et al.*, 2005; CAMARA *et al.*, 2008), leishmanicidas (NAUJORKS *et al.*, 2015; ARAÚJO *et al.*, 2014), anti-inflamatórias (DEJIE *et al.*, 2013) e parasitárias (THOMSON, 1991).

O Lapachol é uma hidrox-naftoquinona isolada de várias espécies de plantas da família Bignoniáceas (Ipê Roxo), encontrado facilmente nas regiões norte e nordeste do Brasil (Figura 10). Conhecido por suas propriedades anticancerígenas, possui ainda antiinflamatória, analgésica, antibiótica, antimalária antitripanossoma, e antiulcerogênica (PATERNO, 1882).

Figura 10- Estrutura química do Lapachol.



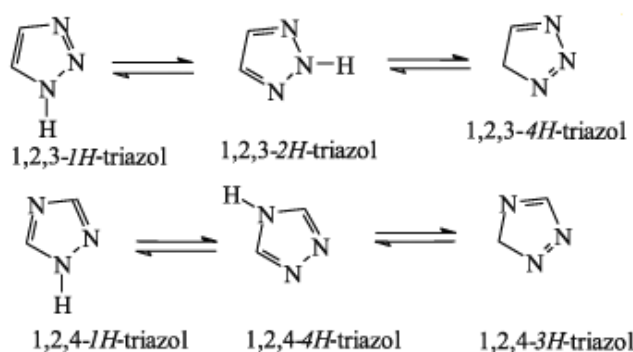
Fonte: Said; Rossana; Davi, 2003.

A atovaquona é uma 1,4- naftoquinona já utilizada no tratamento da malária que apresenta uma excelente atividade antimalárica, porém apresenta propriedades farmacêuticas pobres, como baixa disponibilidade e alta ligação as proteínas plasmáticas devido a sua lipossolubilidade (DRESSMAN; REPPAS, 2000). A Atovaquona é estruturalmente análoga a Ubiquinona, que é a proteína mitocondrial do protozoário que atua no transporte de elétrons, a droga atua competitivamente nessa etapa inibindo a reprodução do parasita (LI; WU, 1998; LOOAREESUWAN; CHULAY, 1999). A monoterapia com atovaquona desencadeou resistência e atualmente é administrada em associação com o antibiótico proguanil, com o nome comercial de Malarone™ (WARSAME *et al.*, 2010).

2.7 Compostos 1,2,3 – Triazólico

Triazóis são compostos heterocíclicos aromáticos formados por anéis de cinco membros contendo três átomos de nitrogênio com orientação nas posições 1,2,3 ou nas posições 1,2,4 do sistema cíclico (Figura 11). Esses compostos vem despertando grande interesse pelo fato de possuírem um vasto campo de aplicações, que vão desde usos de explosivos, até como agroquímicos e fármacos.

Figura 11- Equilíbrio tautomérico em 1,2,3- e 1,2,4-triazóis



Fonte: Júlio et al., 2006

Os compostos 1,2,3- triazólicos vem se destacando no setor farmacológico por serem bioisómeros de compostos que já são muito estudados, como os sistemas 1,2,4- triazólico e tetrazólico, que apresentam um grande número de atividades farmacológicas e já existem relatos de atividade antimalárica quando são híbridos de quinolinas.

Esses compostos possuem excelente solubilidade em água (Log P: -0,27) e podem melhorar a solubilidade da naftoquinona e da atovaquona quando ambas são quimicamente acoplados (LAURIA *et al.*, 2014). Híbridos de Naftoquinonas e triazol apresentam várias vantagens, como: Menores riscos de interação medicamentosa, menor probabilidade de desenvolvimento de resistência medicamentosa, melhora das propriedades farmacocinéticas, aumento do potencial sinérgico e menor custo de tratamento (Guantai *et al.*, 2010; PEDROSA *et al.*, 2017).

2.8 Hibridização molecular

Vários estudos demonstram a hibridização molecular (sobretudo aquelas que envolvem triazol-chalcona e triazol-naftoquinona) como uma interessante estratégia na busca de fármacos cada vez mais eficientes no tratamento de doenças. Essa metodologia proporciona uma boa estratégia para superar a resistência que determinados microrganismos adquirem aos fármacos utilizados no combate às doenças. Ela consiste em uma estratégia clássica de conjugação de estruturas de compostos bioativos distintos em uma única molécula, sendo uma alternativa eficaz de arquitetar racionalmente estruturas moleculares de novos compostos protótipos (BARREIRO; FRAGA, 2014).

Diversos trabalhos demonstram como a hibridização molecular (sobretudo aquelas que envolvem triazol-chalcona e triazol-naftoquinona) é uma interessante estratégia na busca de fármacos cada vez mais eficientes no tratamento de doenças.

A Hibridização molecular é realizada no sentido de se alcançar um dos seguintes objetivos: a) sinergismo de ação farmacológica; b) terapia de dupla ação farmacológica; ou c) modulação de efeitos secundários indesejáveis (AZARA, 2013).

O híbrido de ação sinérgica é obtido quando se unem covalentemente fármacos inteiros, ou apenas os grupos farmacofóricos, e que exibem a mesma atividade farmacológica, mas que atuam em alvos bioquímicos distintos. O objetivo final do híbrido será incrementar uma única atividade farmacológica por vias distintas.

No híbrido de dupla ação são unidos covalentemente fármacos, ou grupos farmacofóricos, com atividades biológicas diferentes, mas que possuem alguma relação com o quadro patológico do enfermo. Neste caso, espera-se que o híbrido, também conhecido como agente simbiótico, exerça duas ações farmacológicas distintas no sentido de combater causas e sintomas decorrentes da doença (BARREIRO; FRAGA, 2014).

Por fim, o híbrido modulador será obtido quando une-se um fármaco, ou grupo farmacofórico, que irá desempenhar a ação terapêutica e produzir uma ação secundária indesejável, a um segundo fármaco, ou grupo farmacofórico, que irá minimizar ou anular o efeito secundário indesejado provocado pelo primeiro (VIEGAS et al., 2007).

Diversos outros trabalhos⁵⁰ mostram como a hibridização molecular (sobretudo aquelas que envolvem triazol-chalcona e triazol-naftoquinona) é uma interessante estratégia na busca de fármacos cada vez mais eficientes no tratamento de doenças.

2.9 Principais métodos de ensaio *in vitro* para a pesquisa de novos antimaláricos

Como ainda não há uma vacina contra a malária, segura e amplamente disponível, os esforços para desenvolver novos medicamentos antimaláricos são cada vez mais importantes. Para superar essa situação várias instituições acadêmicas e sem fins lucrativos estão assinando acordos com grandes indústrias farmacêuticas para desenvolver novos medicamentos.

Uma vez que a grande maioria dos agentes quimioterápicos antimaláricos existentes são baseados em produtos naturais (CASTEL, DA. 1997; CHRISTENSEN, SB; A. KHARAZMI, 2001), a quimiodiversidade biológica continua a desempenhar um papel importante na busca de novos fármacos antimaláricos. Ainda existem poucos novos agentes antimaláricos que estão sob procedimentos de ensaios clínicos e muitos desses agentes são aqueles que foram ressuscitados de programas anteriores de descoberta de medicamentos antimaláricos (GELB, 2007).

Os ensaios de toxicidade *in vitro* empregando várias cepas de *Plasmodium*, desempenham uma etapa crucial na busca de novos agentes antimaláricos (DESJARDINS et al, 1979) e reduzem a carga em nível *in vivo*. Uma vez que o *Plasmodium* é cultivado em eritrócitos, seu crescimento pode ser influenciado indiretamente pelos efeitos da droga na célula hospedeira, com isso testes complementares devem ser realizados para analisar se a atuação do composto teste está ocorrendo diretamente sobre o *Plasmodium* ou não.

2.9.1 Contagem de esquizonte com base em microscopia simples (Microtest)

Desenvolvido por Rieckmann *et al* (1978) o Microtest consiste na preparação de esfregaços sanguíneos de cada poço contendo os compostos teste, onde a atividade *in vitro* é demonstrada como sendo a porcentagem total de esquizontes contados em cada concentração da droga em relação ao total de esquizontes contados em controles livres de drogas. Esse tipo de teste é um dos primeiros sistemas de ensaio da OMS que são projetados para uso como ferramentas de laboratório para auxiliar na vigilância e descrição da epidemiologia da malária resistente a medicamentos como parte do programa de monitoramento global e se destaca devido ao seu baixo custo.

2.9.2 Ensaio a base de radioisótopos

Os parasitas da malária têm células em divisão ativa, logo a adição de substâncias radioativas no meio de cultura permite que os parasitas incorporem os próprios precursores radioativos, sendo assim este ensaio se torna uma medição indireta da atividade metabólica do parasita. Entre os radioisótopos, a hipoxantina é o radioisótopo mais preferido para ensaios de sensibilidade a drogas *in vitro*, pois também é a principal base de purina necessária para *P. falciparum*. Durante este ensaio, em condições normais, a incorporação de [3H] hipoxantina está diretamente relacionada à contagem de eritrócitos infectados por *P. falciparum* (CHULAY *et al.*, 1983; GEARY *et al.*, 1983). A etanolamina é outro exemplo de radioisótopo usado para ensaios semelhantes (ELLABBADI *et al.*, 1992).

O ensaio envolve o uso de contador de cintilação líquida para quantificação da [3H] hipoxantina incorporada, o que eleva o seu custo. Regulamentos rigorosos sobre o manuseio e descarte de material radioativo desde o final da década de 1970, juntamente com o uso de instrumentos de alto custo, limitam aplicação do teste em condições de campo (NOEDL *et al.*, 2003).

2.9.3 Ensaio baseado em enzima

A lactato desidrogenase (LDH) do parasita é uma importante enzima terminal da via glicolítica no parasita *Plasmodium* e, portanto, desempenha um papel vital no metabolismo anaeróbico de carboidratos (MAKLER *et al.*, 1993). O *Plasmodium* depende principalmente da glicólise anaeróbica, e para isso eles precisam da regeneração do NAD para obter um fluxo contínuo de glicose por essa via (SHERMAN, 1998). Como a estrutura enzimática da pLDH é morfologicamente diferente da LDH do hospedeiro, sua produção e acúmulo são usados como índices para verificar a viabilidade do parasita (SHERMAN, 1961; MAKLER *et al.*, 1993; BROWN *et al.*, 2004). Assim, um ensaio de sensibilidade a drogas, que exhibe perfis inibitórios da atividade metabólica do parasita através da estimativa da enzima pLDH, foi desenvolvido por Makler e Hinrichs (1993).

Devido a disponibilidade limitada de anticorpos monoclonais específicos para o pLDH, a sua aplicação tem sido prejudicada. Outro ensaio bastante utilizado é o baseado em proteínas solúveis em água, ricas em histidina e alanina, ou seja HRP II, que se localiza principalmente no citoplasma do parasita (HOWARD *et al.*, 1986). Esse teste se baseia na medição dos níveis de HRP II, que está diretamente associada à densidade do parasita e seu crescimento (DESAKOM *et al.*, 1997; NOEDL *et al.*, 2002).

2.9.4 Triagem de alto rendimento

O princípio básico do ensaio, consiste no fato da citometria de fluxo corar e detectar o DNA do parasita nos eritrócitos humanos. A tecnologia envolve a incubação de parasitas por um período específico com os compostos-teste, seguida de fixação e depois coloração em que todas as células parasitadas podem ser coradas com corante, hidroetidina ou o núcleo do parasita pode ser corado com DAPI, um Tinta fluorescente. Depois disso a citometria de fluxo é utilizada para a contagem de culturas tratadas e de controle e também permite diferenciar os diferentes estágios dos parasitas no interior dos eritrócitos. É um ensaio

relativamente simples e de alto rendimento porém a sua grande limitação se dá em virtude do alto custo (VAN VIANEN et al., 1990).

3 JUSTIFICATIVA

A malária representa um dos principais problemas de saúde pública no mundo em desenvolvimento e, no continente americano, o destaque ainda é o Brasil. O país tem cerca de 42% dos casos da doença registrados nas Américas. Em 2016, o país registrou 117.832 casos da doença em nove estados. Em 2017, o número chegou a 174.522, valor que representa um aumento de 48%. O Estado mais afetado é o Amazonas, com cerca de 109.449 casos de malária, entre janeiro e agosto de 2017, sendo 48% a mais do que o ano de 2016, seguido por Pará e Acre.

Os fármacos atualmente utilizados na quimioterapia da malária adotam a utilização de associações medicamentosas de compostos 4- e 8-aminoquinolínicos sintéticos, como mefloquina e primaquina, com derivados endoperóxidossemi-sintéticos da artemisinina: o arteméter, o arteeter e o artesunato (WHITE, 2008; ECKER *et al.*, 2012). Porém, a resistência do *Plasmodium* as drogas é um problema significativo e que tem se tornado um dos principais agravantes no controle da malária no Brasil e no Mundo, tendo em vista que o aumento da resistência aos antimaláricos usuais vem ocorrendo de maneira muito mais acelerada do que o desenvolvimento e a implementação de novos fármacos (JANA; PALIWAL, 2007; GARDINER *et al.*, 2009; GARCIA-BUSTOS; GAMO, 2013). Neste contexto, é necessário buscar incessantemente novos compostos com ação antimalárica como ferramenta útil no combate às cepas de *Plasmodium*, sobretudo as resistentes. Como substância protótipo, destaca-se a 1,4-naftoquinona contendo triazólico.

O projeto é de extrema importância, visto que o mesmo busca superar desafios na área terapêutica com a possível incorporação de novas drogas ao tratamento da malária, para assim encontrarmos soluções que possam minimizar ou até mesmo erradicar essa doença no nosso País.

4 HIPÓTESE

Os compostos derivados da 2-amino-1,4-naftoquinona conjugada com o anel 1,2,3 – triazólico atuam sobre o *Plasmodium falciparum* em estudos *in vitro*.

5 PERGUNTA CONDUTORA

Os compostos derivados da 2-amino-1,4- naftoquinona conjugada com o anel 1,2,3 – triazólico desempenham uma atividade anti-malária sobre o *Plasmodium falciparum* em estudos *in vitro*?

6 OBJETIVO

6.1 Objetivo geral

Investigar um novo composto derivados da 1,4-naftoquinonas contendo o anel 1,2,3-triazólico contra o *P. falciparum* como potencial candidato a nova droga de uso clínico para o tratamento da malária.

6.2 Objetivos específicos

- a) Determinar o potencial antimalárico *in vitro* dos novos compostos frente a cepa W2 (cloroquina-resistente);
- b) Avaliar a ação citotóxica dos novos compostos;
- c) Avaliar a capacidade hemolítica dos novos compostos *in vitro*;

7 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

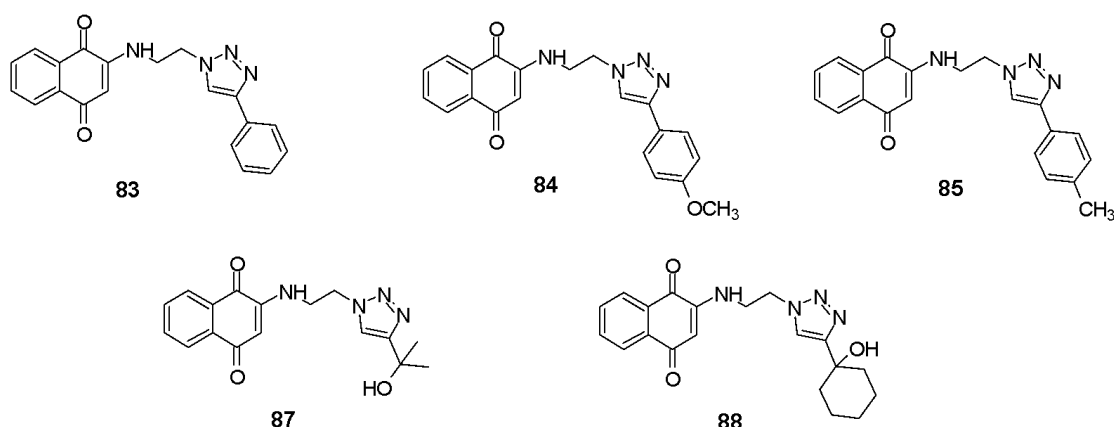
7.1 Desenho do estudo

Trata-se de um estudo analítico experimental de intervenção.

7.2 Síntese dos compostos 2- amino- 1,4- naftoquinonas com anel 1,2,3 triazólico

A Síntese e a identificação estrutural dos derivados híbridos da naftoquinona e do triazol avaliados, foram realizadas no Laboratório de Síntese de Compostos Bioativos da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), sob a coordenação do professor Dr. Ronaldo Nascimento de Oliveira. As condições reacionais e os processos químicos foram anteriormente estabelecidos e publicados pelo grupo de pesquisa da UFRPE (EMILAY.B.T *et al.*, 2013; TIAGO.T.G *et al.*, 2013; EUFRÂNIO.N *et al.*, 2012). Todos os compostos foram estruturalmente identificados através das principais propriedades físicas, cromatográfico-espectrométricas (CCD, CG-EM) e espectroscópicas (IV, UV, RMN de ^1H e ^{13}C) (Figura 12).

Figura 12- Derivados sintéticos da 1,4-naftoquinona



Fonte: NASCIMENTO, 2018

7.3 Testes *in vitro*

7.3.1 Cepa

Foi utilizada neste estudo a cepa de referência W2 (cepa de *P. falciparum* cloroquina-resistente, com origem em Indochina).

7.3.1.1 Descongelamento das cepas

O criotubo foi retirado do galão de N₂ e após descongelar foi transferido para um falcon de 50 ml. Se o volume de sangue a ser utilizado na cultura do *Plasmodium* for maior que 1 ml será adicionado 0,4 ml de NaCl 1,2%, e se caso o volume de sangue for menor que 1ml, será adicionado 0,2 ml de NaCl 1,2%. Após um repouso de 5 min, foi adicionado 9 ml de NaCl 1,6%. A cepa foi centrifugada a 1200 rpm/5min e então foi retirado o sobrenadante. O material foi ressuspensionado em 5 ml de meio RPMI incompleto e foi novamente centrifugado a 1200 RPM/5min. O sobrenadante foi descartado e foi adicionado 4,5 ml de meio completo. O conteúdo obtido foi transferido para uma garrafa de cultivo e será adicionado 500µl de sangue lavado.

7.3.2 Antimalárico de referência e compostos teste

A cloroquina (SIGMA ALDRICH®) foi utilizada como controle de referência. Os compostos foram pesados analiticamente e solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO – SIGMA ALDRICH®), para obtenção de uma solução estoque de 10µM.

7.3.3 Cultivo *in vitro* das fases intra-eritrocitárias de *Plasmodium falciparum*

Os parasitos foram cultivados em hemácias humanas (sangue tipo O+) *in vitro*. Os parasitos foram cultivados utilizando o método de Trager e Jensen (1976), com modificações descritas por Andrade-Neto et al. (2007). Os parasitos foram cultivados em placas de Petri com hematócrito a 5% usando meio RPMI 1640 suplementado com 25 mM de HEPES, 21 mM de bicarbonato de sódio, 300 µM de

hipoxantina, 11 mM de glicose, 40 µg mL⁻¹ de gentamicina e 10% (v/v) de plasma humano inativado tipo O+. As placas foram mantidas em estufa à 37°C em dessecadores com uma concentração adequada de O₂, onde foram realizadas trocas diárias do meio. A parasitemia foi determinada diariamente por meio de esfregaços sanguíneos das culturas fixados com metanol e corados com solução de Giemsa. O cálculo da parasitemia foi realizado segundo a fórmula descrita abaixo:

$$\text{Parasitemia} = \text{Número de hemácias parasitadas} / \text{Número de hemácias totais}$$

7.3.4 Sincronização do cultivo de *Plasmodium falciparum*

As culturas de *P. falciparum* foram sincronizadas pelo método de sorbitol para obtenção de uma amostra com predomínio de fase jovem (anel) para os ensaios *in vitro*, como descrito por Lambros and Vanderberg (1979). Esse método baseia-se no fato dos eritrócitos infectados com parasitos com mais de 20 horas de desenvolvimento intra-eritrocitário, apresentarem uma maior fragilidade osmótica, sendo lisados devido à ação do D-sorbitol. A cultura foi centrifugada a 1800 rpm/ 5 minutos e 5 mL de D-sorbitol a 5% foram adicionados ao precipitado. Após 5 minutos de incubação em banho-maria à 37°C, a cultura foi centrifugada novamente e lavada com RPMI sem Albumax I. As hemácias remanescentes voltaram para as condições de cultura-padrão.

7.3.5 Ensaio anti-malárico *in vitro*

Os compostos teste foram inicialmente preparados em soluções estoque, utilizando meio de cultura incompleto, isto é, sem plasma e sem hipoxantina, contendo 0,01%-0,2% de tween 20 ou 0,1% DMSO. A partir daí foram preparadas diluições das drogas em uma razão de 1:3 partindo de 300µg/mL até 0,411µg/mL. As culturas sincronizadas com 1-2,5% de parasitemia foram ressuspendidas em meio de cultura completo para hematócrito de 10% e distribuídas em placas de 96 poços, colocando-se 110µl por poço. Após aproximadamente 2 horas a 37°C em estufa úmida de CO₂ ou dessecador, o meio deverá ser retirado de todos os poços e, esfregaços sanguíneos foram confeccionados de 4 a 6 poços, escolhidos

aleatoriamente, para a obtenção da parasitemia inicial. Em seguida, foi acrescentado a cada poço apenas meio contendo as diferentes concentrações das drogas teste e a cloroquina (antimalárico de referência). Após 48 horas de incubação dos parasitos a 37°C em atmosfera de CO₂ e microarofilia, o meio foi retirado de cada poço para confecção do esfregaço sanguíneo para avaliação de parasitemia. Após fixação com metanol e coloração pelo Giemsa, foram examinados ao microscópio ótico (1000x) para determinação de percentagem de hemácias parasitadas. A média da parasitemia calculada nos cultivos controle sem droga foi utilizada na avaliação das taxas de crescimento do parasito nos poços com as drogas testes e com o antimalárico de referência. A atividade das drogas foi expressa pela porcentagem de redução da parasitemia em relação aos controles sem drogas. Como critério de atividade *in vitro*, estabeleceu-se que as drogas que inibiram em 80 a 100% o crescimento dos parasitos seriam consideradas ativas; parcialmente ativas quando a inibição fosse de 50 a 79%; e inativas quando a inibição fosse menor que 50%, na concentração mais alta da droga testada. A concentração que inibe 50% da viabilidade dos parasitos (IC₅₀) foi determinada em comparação com o controle sem a presença dos compostos (considerado 100% de viabilidade).

7.3.6 Ensaios de citotoxicidade

A citotoxicidade dos compostos sintéticos foi avaliada utilizando contra as linhagens celulares HepG2 e Vero, pelo ensaio redução do 3-(4,5 dimetiliazol-2il)-2,5 difeniltetrazólico (MTT). As células foram transferidas para uma placa de 96 poços na concentração de 1x10⁴ células/poço (Vero) e 1x10⁶ (HEPG2) e incubadas por 24h em estufa a 37°C e atmosfera úmida de 5% CO₂. Os compostos testados foram adicionados em diferentes concentrações que variam de 1000 a 0,1 µg/mL⁻¹. Após 48h horas de incubação, os poços foram lavados com meio incompleto e foi adicionado o sal tetrazólico MTT na concentração de 5 mg/mL⁻¹. Após 4 horas de incubação, o sobrenadante foi descartado e foi acrescentado 100 µL de DMSO em cada poço para solubilizar os cristais de formazan. A leitura foi realizada em espectrofotômetro de microplacas (Espectramax M5e/Molecular Devices) com filtro de 570 nm. A concentração que inibe em 50% o crescimento das células (CC₅₀) na presença dos compostos testes e dos antimaláricos controles foi

determinada em comparação com células cultivadas sem a presença de compostos (considerada 100% de crescimento).

7.3.7 Teste de Hemólise

Para garantir que a ação dos compostos testados ocorresse diretamente sobre o parasito e não pela lise das hemácias hospedeiras, eritrócitos humanos foram incubados com diferentes concentrações das substâncias por 1 hora em estufa a 37°C, baseada na metodologia de Randwan *et al* 2017. O potencial hemolítico foi verificado por leitura espectrofotométrica a 450 nm. Os valores foram convertidos em porcentagem de hemólise em relação ao controle com Triton (0,1%) pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ hemólise} = \text{Absorbância teste} \times 100 / \text{absorbância do controle} + \text{ou} -$$

Onde: Absorbância teste é a absorbância das amostras teste, multiplicado por 100 e dividido pela média da absorbância dos controles (ABS C+ OU ABS C-).

7.3.8 Determinação da concentração inibitória de 50% do crescimento dos parasitos e das linhagens celulares

A inibição do crescimento de 50% dos parasitos (IC₅₀) e das células (CC₅₀) foi determinada através de curvas dose-resposta, em função de regressão não linear. Foi utilizado o programa Origin versão 8.0 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, EUA), para determinar o valor de IC₅₀.

7.3.9 Índice de seletividade

O índice de seletividade (IS) é a relação entre as atividades citotóxicas e antiparasitárias de cada composto. O IS será obtido através da razão entre o valor de CC₅₀ para as linhagens celulares e IC₅₀ para *P. falciparum* (cepa W2):

$$IS = CC_{50} (\text{HepG2 e Vero}) / IC_{50} P. \textit{falciparum} (\text{cepa W2})$$

Valores maiores que 10 são considerados indicativos de ausência/moderada toxicidade, enquanto substâncias com valores abaixo de 10 são consideradas tóxicas (BÉZIVIN *et al.*, 2003).

7.4 Considerações Éticas

Os 20 voluntários recrutados para coleta de sangue para o teste de hemólise foram esclarecidos sobre a pesquisa e receberam o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Apêndice A) para assinarem em duas vias, referente à sua participação na pesquisa. O projeto foi aprovado pelo Comitê de ética – Registro CAE: 30756820.6.0000.5190 (ANEXO B), observando-se os cuidados necessários para preservar a liberdade de consentimento e a privacidade das informações dos participantes.

7.5 Análise Estatística

Após a obtenção dos resultados das amostras testadas, a apresentação das variáveis mensuradas foi realizada através de tabelas e gráficos apresentando média aritmética, desvio padrão ou mediana. Os valores numéricos obtidos foram analisados estatisticamente através do software Microcal Origin versão 8. O teste do *Qui Quadrado* foi utilizado para os cálculos de probabilidade. O valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

8 RESULTADOS

8.1 Ensaio de Citotoxicidade

A citotoxicidade dos compostos frente as linhagens celulares HepG2 e Vero foi observada através do ensaio de redução do 3-(4,5 dimetiliazol-2il)-2,5 difeniltetrazólico (MTT). Todos os 5 compostos foram testados, e partiram da concentração de $1000\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ até $0,1\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ (Tabela 2). Em geral, Os compostos apresentaram baixa citotoxicidade, com destaque para o MGS88 que obteve o maior CC_{50} frente aos dois tipos celulares.

Tabela 2- CC_{50} dos compostos 83, 84,85, 87, 88.

Composto	HEPG2	VERO
	CC50	
Cloroquina	>200	35,76
83	278,2	115,9
84	289,2	400,6
85	104,0	206,8
87	232,9	188,4
88	440,9	1336

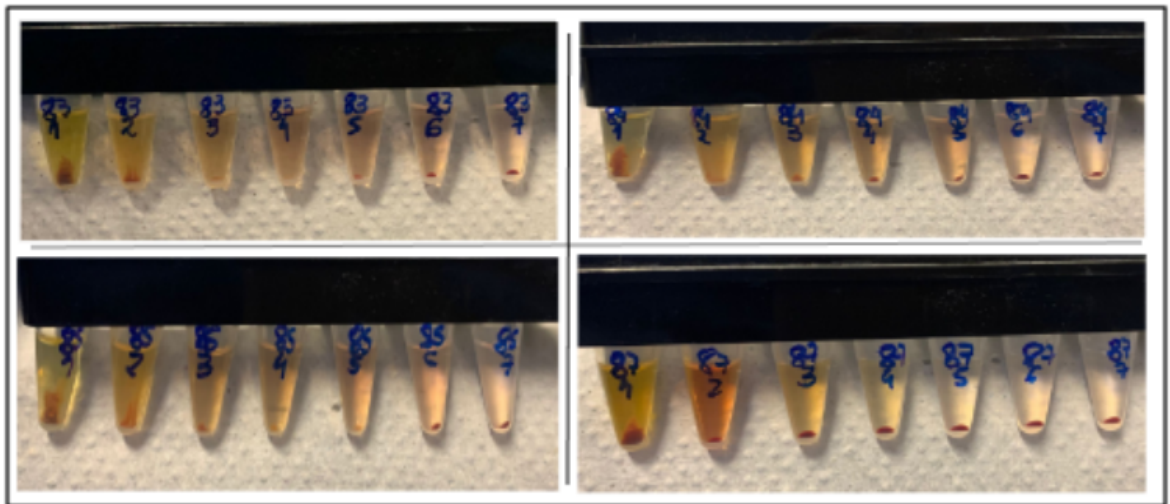
Fonte. Elaborada pela autora, 2019

8.2 Ensaio de Hemólise

Como medida de citotoxicidade *in vitro* foi avaliada também a taxa de hemólise causada pelos compostos às hemácias humanas não infectadas, em duas concentrações, partindo de diluições seriadas de $1000\mu\text{g}$ até $15,62\mu\text{g}$, e dos controles positivo (triton) e negativo (salina) (Figura 13, 14,15). Todos os compostos apresentaram taxa de hemólise <10%, sendo o composto 84 o que apresentou as

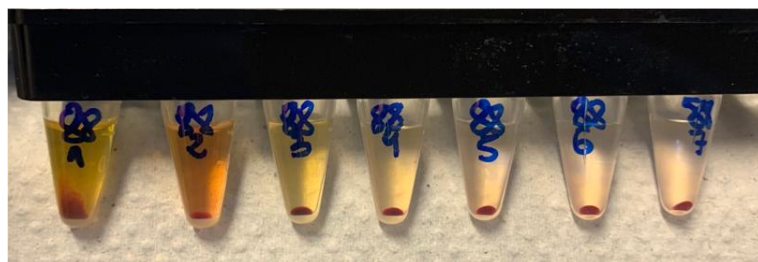
menores taxas nas concentrações observadas (31,25µg e 15,62µg), 5,12% e 4,97% respectivamente. Dos 5 compostos testados o 87 foi o que apresentou as maiores taxas de hemólise, sendo 7,02% na concentração de 31,25ug e 6,10% na concentração de 15,62%, ainda assim valores bem significativos uma vez que são menores que 10% (Figura 16).

Figura 13- Teste de hemólise referente as 7 diluições dos compostos 83, 84,85, e 87.



Fonte. Elaborada pela autora, 2020.

Figura 14- Teste de Hemólise referente as 7 diluições do composto 88.



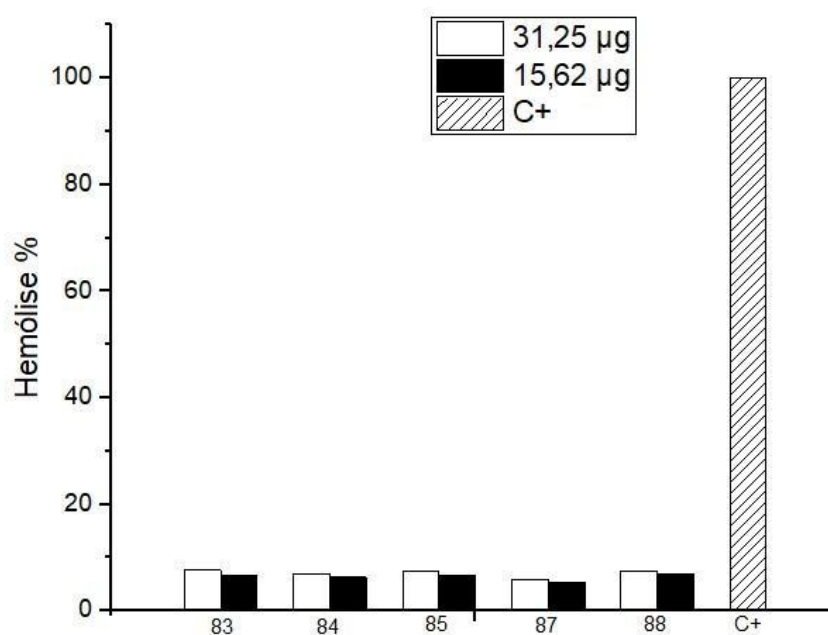
Fonte. Elaborada pela autora, 2020.

Figura 15- Teste de hemólise referente aos controles positivo (Triton) e negativo (salina).



Fonte. Elaborada pela autora, 2020.

Figura 16- Porcentagem de hemólise *in vitro* dos compostos 83, 84, 85, 87, 88.



Fonte. Elaborada pela autora, 2020.

8.3 Ensaio antimalárico *in vitro*

Os testes antimaláricos foram realizados com os cinco compostos derivados da 2-amino-1,4naftoquinona conjugada com o anel 1,2,3 trizol, frente a cepa W2 (cloroquina-resistente), utilizando para isso a cloroquina como controle positivo.

Após a realização dos experimentos, os resultados demonstraram que os compostos-teste possuem atividade antiplasmodial significativa (Tabela 3).

Tabela 03- Atividade antimalárica *in vitro* dos compostos 83, 84, 85, 87 e 88 frente a cepa W2.

Compostos	IC ₅₀ (μM)	CC ₅₀ (μM)		IS*	
	<i>P. falciparum</i> (W2)	HepG2	Vero	HepG2	Vero
83	13,6	278,2	115,9	20,45	8,5
84	10,69	289,2	400,6	27,05	37,47
85	13,95	104	206,8	7,45	14,8
87	15,63	232,9	188,4	14,9	12,05
88	13,37	440,9	1336	33,0	99,9
Cloroquina	0,28	> 200	35,8	~714,3	127,8

Fonte. Elaborada pela autora, 2021.

9. DISCUSSÃO

O aumento do número de cepas resistentes aos antimaláricos empregados atualmente somado a dificuldade na obtenção de uma vacina eficiente comprovam a necessidade de um novo medicamento seguro e eficaz contra a malária. Além disso, o controle do mosquito vetor é bastante complexo, uma vez que estes também, adquiriram resistência aos inseticidas (NA-BAGCHANG & KARBWANG, 2009; ARAMA & TROYE-BLOMBERG, 2014).

O número de estudos voltados à busca de compostos naturais bioativos que possam ser utilizados no tratamento de doenças parasitárias têm aumentado consideravelmente (JR COURA, & SL CASTRO, 2002). Algumas naftoquinonas naturais surgiram como temas promissores na pesquisa da química medicinal devido às suas propriedades estruturais. Esses compostos podem gerar espécies reativas de oxigênio (ROS), que levam ao estresse oxidativo e, posteriormente à morte do parasita (AV PINTO; SL CASTRO, 2009)

A versatilidade e diversidade funcional das quinonas são devidas principalmente aos diversos potenciais de ponto médio que são sensíveis a efeitos de substituintes, solventes e efeitos médios (hidrofílicos/ lipofílico) e interações com certas macromoléculas (DNA e proteínas). As propriedades eletrônicas das quinonas são influenciadas por grupos substituintes, ligação de hidrogênio (ligação H), interações hidrofóbicas e de empilhamento p. Esses fatores atuam em conjunto para estabilizar o radical semiquinona. O mecanismo de ação das naftoquinonas no meio intracelular consiste na formação de uma semiquinona, a qual reduz o oxigênio molecular produzindo o ânion radical superóxido O_2^- . A enzima superóxido dismutase (SOD) converte este ânion em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que, por sua vez se decompõe em água e oxigênio molecular, pela enzima Catalase (CAT). No entanto, a presença do cátion Fe^{+3} no meio leva o H_2O_2 a uma rota de decomposição alternativa, a qual tem como produto, além da água e do oxigênio molecular o radical hidroxil (OH). Este último interage diretamente com o DNA causando danos que resultam na morte celular (CASTRO et al., 2013).

Hussein *et al.*, (2013) demonstrou através do seu estudo que a interação das 1,4-naftoquinonas com a membrana celular inicialmente ocorre com a interação das

carbonilas com a parte polar da camada lipídica e em seguida a porção aromática interage com as cadeias alquílicas, interferindo nas propriedades visco-elásticas da membrana celular, o que acarreta a inibição do crescimento celular, além de dificultar o processo de angiogênese. As 1,4-naftoquinonas são capazes de inibir a enzima topoisomerase II, essencial à duplicação do DNA, interferindo assim, na multiplicação celular (PRACHAYASITTIKUL et al., 2014).

Com o objetivo de potencializar a toxicidade da 1,4-naftoquinona, pesquisas são direcionadas à hibridização molecular, que hoje em dia, tem se mostrado uma ferramenta promissora para o processo de design de fármacos e química medicinal. Nesta estratégia, duas ou mais unidades farmacofóricas diferentes são covalentemente ligadas em uma única molécula híbrida com melhores propriedades em comparação com os medicamentos originais. Hibridização molecular é benéfico pois diferentes alvos são ativados por uma única molécula, e é particularmente interessante onde o tratamento é limitado a alguns medicamentos comerciais ou nos casos em que os compostos bioativos apresentam limitações farmacocinéticas e farmacodinâmicas ou alta toxicidade. Um dos exemplos que vem se mostrando eficaz na melhora da resposta biológica em associação com a porção 1,4-naftoquinona é o heterociclo 1,2,3-triazólico (AGALAVE et al., 2011), e a literatura relata que essa associação origina compostos biologicamente ativos.

O anel 1,2,3-triazólico é obtido pela cicloadição 1,3-dipolar entre uma azida e um alcino. O anel é considerado bioisómero das amidas, o que lhe confere grande diversidade no que se refere as atividades biológicas. Se destacam ainda por serem estruturas mais estáveis que as amidas, uma vez que não sofrem hidrólise, oxidação ou redução (Freitas *et al.*, 2011). Os triazóis apresentam uma variedade de aplicações (Manohar *et al.*, 2011), incluindo agentes farmacêuticos, agroquímicos, aplicações industriais, como tinturas, corrosão inibição, fotoestabilizadores e materiais fotográficos (Sharghi *et al.*, 2009). O anel apresenta um núcleo estável contra hidrólise ácida e básica, bem como contra oxidação e condições redutivas. Ele também tem excelente solubilidade em água (Log P: -0,27) (Lauria *et al.*, 2014b) e poderia melhorar a solubilidade de naftoquinonas como a atovaquona quando ambos farmacóforos são quimicamente acoplados. Da Silva *et al* (2012), realizou um estudo onde uma série de compostos híbridos de 2-bromo-1,4-naftoquinona e 1,2,3-triazol foram sintetizados e avaliados contra a forma infecciosa de

Trypanosoma cruzi, o agente etiológico da doença de Chagas, onde dois desses compostos se destacaram. Essas propriedades antiprotozoárias, portanto, indicam que a hibridização molecular de 1,4-naftoquinonas e 1,2,3-triazóis pode produzir compostos antimaláricos significativos.

Para que uma droga seja empregada no mercado farmacêutico são necessários vários estudos que comprovem a sua segurança e eficácia. Os ensaios pré-clínicos correspondem às pesquisas conduzidas com o objetivo de descobrir ou confirmar os efeitos farmacológicos e identificar os efeitos tóxicos do medicamento em experimentação que podem ser realizados *in vivo*, *in vitro* e em *ex vivo* (BRASIL,2013). Neste estudo, cinco compostos derivados da 2-amino- 1,4 naftoquinona conjugada com o anel 1,2,3 triazol foram testados frente à cepa W2 (cloroquina-resistente) como candidatos a fármacos para a terapia antimalárica.

A dose do composto que mata ou inativa 50% dos parasitas presentes na amostra, o IC_{50} , é um estimador da eficácia *in vitro* de um composto. De maneira geral os compostos apresentaram uma atividade antimalárica bastante satisfatória, com concentrações inibitórias de 50% baixas, variando de 10,69 μ M até 15,63 μ M (4,0 μ g/mL até 5,1 μ g/mL) frente à cepa W2 (cloroquina-resistente), sendo portanto considerados compostos com alta atividade antimalárica. Lanfranchi *et al.* (2012) testaram 10 compostos derivados de naftoquinonas e obtiveram uma média de IC_{50} > 50 μ M. Todos os cinco compostos foram capazes de inibir mais de 88% da parasitemia já na primeira diluição (30 μ g/mL). O composto 84 foi o que obteve o menor valor de IC_{50} (10,69 μ M) e foi capaz de inibir mais de 90% da parasitemia na primeira diluição, demonstrando uma excelente atividade antiplasmodial.

A hemólise induzida por fármacos, constitui uma ocorrência grave e pode ocorrer por dois mecanismos: hemólise alérgica (toxicidade causada por uma reação imunológica em doentes previamente sensibilizados para um fármaco) e hemólise tóxica (toxicidade direta do fármaco, do seu metabolito ou um excipiente na formulação) (DAUSSET J, CONTU L, 1967). Os fármacos, os seus metabolitos ou excipientes utilizados na formulação podem causar hemólise tóxica, sendo necessário avaliar a atividade hemolítica dos fármacos e dos novos compostos. Somado a isso a realização do ensaio de hemólise como um dos parâmetros de medida de toxicidade *in vitro*, no presente estudo, é ainda mais importante pelo fato

desse ensaio nos indicar se a eficácia do composto está ocorrendo devido a sua atuação diretamente no *Plasmodium falciparum* ou se está relacionada a lise das hemácias (CHEN *et al*, 2004). Tratando-se o presente trabalho da seleção *in vitro* de candidatos a fármacos, apenas foi avaliado o possível efeito de hemólise tóxica dos compostos isoladamente. Neste contexto, a hemólise é definida como uma alteração/destruição de eritrócitos que resulta na liberação de hemoglobina para o meio (KRZYZANIAK JF, 1997).

Todos os cinco compostos apresentaram grau de hemólise <10%, valor considerado para a classificação de não hemolítico. Valores de % de hemólise > 25% são considerados como indicativos de risco de hemólise (AMIN K, DANNENFELSER R-M, 2006). Estudos recentes sobre atividade hemolítica de derivados de naftoquinonas corroboram os resultados obtidos referindo ausência de atividade hemolítica *in vitro* significativa para este grupo de compostos (VALESKA S, 2016). Tais resultados são relevantes, uma vez que a primaquina, utilizada no tratamento da malária ocasionada pelo *P.vivax*, para evitar os relapsos causados pelos hipnozoítos, causa toxicidade sanguínea e induz a formação de metahemoglobina, especialmente em pacientes com deficiência de G6PD, resultando em uma anemia hemolítica grave (FERNANDO *et al.*, 2011; DAVANÇO *et al.*, 2014).

Um critério importante na pesquisa de compostos ativos com atividade antimalárica é a sua citotoxicidade em células hospedeiras de mamíferos. As células utilizadas para o ensaio de citotoxicidade *in vitro* foram as células HepG2 (linhagem celular de hepatocarcinoma humano) e a VERO (linhagem celular oriunda de rim de macaco verde africano). Dentre os cinco compostos o 88 foi o que obteve os maiores valores de CC_{50} frente as duas linhagens celulares avaliadas e com isso foi o que obteve o maior índice de seletividade.

Quanto maior for o IS, mais promissor como anti-malárico será o composto, devido à sua ação seletiva contra o parasita *P. falciparum* (JONVILLE MC, 2008). Somado a isso quando maior for o IS, maior a janela terapêutica, o que significa uma melhor segurança farmacológica, uma vez que a dose ingerida pelo paciente será muito menor que a dose que apresenta algum efeito tóxico. Geralmente, um valor de $IS \geq 10$ indica que um composto apresenta uma janela terapêutica aceitável no

desenvolvimento de fármacos anti-maláricos (KATSUNO K, et al. 2015; Weniger B, et al. 2001; CARGNIN ST, 2017). Dos 5 compostos apenas 2 obtiveram $IS < 10$ frente a uma única linhagem celular, o 83 apresentou $IS 8,5$ e o 85 $7,45$. O Índice de seletividade dos demais compostos situam-se entre $12,05 - 99,9$, assim encontram-se dentro do intervalo de segurança aceitável para prosseguir o seu desenvolvimento e melhoramento como possíveis anti-maláricos. Não obstante, seria necessário realizar mais estudos, nomeadamente ensaios *in vivo* para considerar estes compostos como sendo seguros.

Souza et al. (2014) usaram esse parâmetro avaliativo, encontrando um dos derivados de naftoquinonas com efeito tóxico, IS igual a 3 para cultura de células HepG2 e igual a 5,4 para cultura de células BGM. Já em um estudo com 6 derivados de naftoquinonas em células HL-772, Guo et al (2012) encontraram que o composto 2-hidroxi-1,4 naftoquinonas foi o menos tóxico. Um antimalárico já utilizado na quimioterapia da malária, a sulfadiazina, tem IC_{50} mais elevado que os nossos achados ($33\mu M$) e IS muito baixo (8) (CLOETE et al., 2014), confirmando a importância dos resultados obtidos no presente estudo, sendo o composto MGS88 o mais promissor para o processo “*hit-to-lead*” (otimização de um ligante bioativo a composto líder) (RUBIO-RUIZ et al., 2014).

O coeficiente de partição ($\log P$) é um parâmetro frequentemente utilizado em estudos como medida quantitativa de lipofilicidade de compostos bioativos sendo relacionada a atividade dos mesmos (AMARAL, A. T. et al, 1997). Lipossolubilidade é a razão entre a concentração do fármaco na fase orgânica e concentração do fármaco na fase aquosa, portanto quanto maior a lipossolubilidade maior a afinidade do fármaco de atravessar as membranas plasmáticas constituídas por uma bicamada lipídica (fosfolipídios). O composto 88 apresenta um $\log P = 2,55$, sendo portanto um valor moderado que é o ideal para que o composto alcance uma maior permeabilidade. Valores de $\log P$ entre 0 e 3 conferem com um bom balanço entre permeabilidade e solubilidade.

A atovaquona, medicamento bastante conhecido da classe das naftoquinonas utilizado atualmente na terapia da malária em combinação com o proguanil, apresenta uma excelente atividade antiplasmodial, porém tem propriedades farmacêuticas pobres, como baixa biodisponibilidade e alta ligação as proteínas

plasmáticas devido à lipossolubilidade (DRESSMAN e REPPAS, 2000). Como forma de melhorar a biodisponibilidade, alguns análogos da atovaquona foram criados onde foram feitas mudanças no motivo naftoquinoidal, principalmente na cadeia lateral de alquila, porque se sabe que a modificação desta cadeia pode alterar a atividade da droga (FIESER, *et al.*, 1948).

10. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesse trabalho nos permitiram as seguintes conclusões:

- Os compostos derivados da 2-amino-1,4- naftoquinona conjugada com o anel 1,2,3 – triazólico com baixos valores de IC_{50} , obtiveram uma atividade antimalárica bastante satisfatória.
- Entre os 5 compostos testados, o composto 88 foi o que obteve os melhores resultados, maior CC_{50} frente as duas linhagens celulares, melhor índice de seletividade (o que confere uma maior janela terapêutica) sendo portanto o nosso composto *hit*.
- O composto 83 foi o que obteve o menor valor de IC_{50} e 2º melhor valor de IS.
- Nenhum dos 5 compostos causou hemólise acima de 10% nas doses testadas, sendo portanto compostos não hemolíticos.

REFERÊNCIAS

ACKERKNECHT, E. H. Malaria in the Upper Mississippi Valley. Johns Hopkins Press: Baltimore, p. 1760-1900, 1966.

ADL, S. M. *et al.* The revised classification of eukaryotes. Journal of Eukaryotic Microbiology, v. 59, n. 5, p. 429-514, 2012.

ADL, S.M. *et al.* The New Higher Level Classification of Eukaryotes with Emphasis on the Taxonomy of Protists. Journal of Eukaryotic Microbiology, v.52, n. 5, p. 399-451, 2005.

AGUIAR, A. C. C. *et al.* New approaches in antimalarial drug discovery and development: a review. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 107, p. 831-845, 2012

AZARA, P. O.; Dicionário de substâncias farmacêuticas comerciais. Associação Brasileira de Indústria Farmoquímica (ABIQUIF): Rio de Janeiro, v.5, p724, 2013. 2013.

AMINO, R. *et al.* Quantitative imaging of Plasmodium transmission from mosquito to mammal. Nature Medicine, v. 12, n. 2, p. 220-224, 2006.

ANDRADE BB. *et al.* Towards a precise test for malaria diagnosis in the Brazilian Amazon: comparison among field microscopy, a rapid diagnostic test, nested PCR, and a computational expert system based on artificial neural networks. Malaria Journal, v.9, p.117, 2010.

ARAÚJO, M. V. *et al.* Molecules, v. 19, p.15180, 2014.

BABULA, P. *et al.* Noteworthy Secondary Metabolites Naphthoquinones – their Occurrence, Pharmacological Properties and Analysis. Current Pharmaceutical Analysis, v. 5, p. 47-68, 2009.

BACELLAR, R.C. Brazil's contribution to Tropical Medicine and Malaria. Rio de Janeiro. 1963.

BAIRD JK. Pernicious and Threatening Plasmodium vivax as Reality. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v. 91, n.1, p.1–2, 2014.

BALINT, G. A. Artemisinin and its derivatives - An important new class of antimalarial agents. Pharmacology & Therapeutics, v. 90, n. 2-3, p. 261-265, 2001.

BARBOSA, T. P. *et al.* New 1,2,3,4-tetrahydro-1-aza-anthraquinones and 2-aminoalkyl compounds from norlapachol with molluscicidal activity. Bioorganic & Medicinal Chemistry, v.13, p.6464-6469, 2005.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. Química Medicinal: As bases moleculares da ação dos fármacos. Artmed Editora, 2014.

BECKER, N. *et al.* Mosquitoes and Their Control, v. 2, 2010.

BÉZIVIN, C. *et al.* Cytotoxic activity of some Lichen extracts on murine and human câncer cell lines. Phytomedicine, v. 10, p. 499-5-3, 2003.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia prático de tratamento da malária no Brasil, 2010.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de diagnóstico laboratorial da malária. Brasília: Ministério da Saúde (Série A. Normas e Manuais Técnicos), p.112, 2005.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de Vigilância em Saúde. Brasília, 2014.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico. Brasília, v.46, n.25. 2015.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. coordenação-geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. Guia de vigilância em saúde: volume único, 3. ed. Brasília: Ministério da Saúde, p. 740, 2019.

BRUCE-CHWATT, L. Essential malariology. 2 ed. John Wiley and Sons.New York, v.452, 1985.

CAMARA, C. A. *et al.* Molluscicidal activity of 2-hydroxy- [1,4]naphthoquinone and derivatives. Anais da Academia Brasileira de Ciências, v.80, p.329-334, 2008.

CASARES, S; BRUMEANU, T.D; RICHIE, T.L. The RTS, S malaria vaccine. Vaccine, v. 28, p. 4880-4894, 2010.

CASTEL, DA. Agentes antimaláricos. Química medicinal de burguer e descoberta de drogas. Nova York, v. 5, p. 3-91. 1997

CAMARGO, E. P. Malária, Maleita, Paludismo. Endemias, p. 26-30, 2003.

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

CHRISTENSEN, SB. et al. Produtos naturais antimaláricos. Compostos bioativos de fontes naturais: isolamento, caracterização e propriedades biológicas. Londres, p. 380-431.1997.

COSTA AP. *et al.* Diagnóstico tardio de malária em área endêmica de dengue na extra-Amazônia brasileira: experiência recente de uma unidade sentinela no Estado do Rio de Janeiro. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, n. 43, v.5, p.571-574, 2010.

COSTA, K. M. D. M. *et al.* Malária em Cruzeiro do Sul (Amazônia Ocidental brasileira): análise da série histórica de 1998 a 2008. Revista Pan-americana de Saúde Pública, v. 28, n. 5, p. 81-82, 2010.

CHULAY et al. *Plasmodium falciparum*: avaliação do crescimento in vitro pela incorporação de hipoxantina. Parasitol, v.55, p.138-146, 1983.

CRAVO, P. *et al.* Antimalarial drugs clear resistant parasites from partially immune hosts. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v.45, n.10, p. 2897-2901, 2001.

CUI, L; SU, X. Z. Discovery, mechanisms of action and combination therapy of artemisinin. Expert Review of Anti- Infective Therapy, v.7, n.8, p.999-1013, 2009.

DA SILVA, A.M.P. *et al.* Biológica de Naftoquinonas de Espécies de Bignoniaceae. Revista Fitos, v.7, n.04, p. 207-215, 2012.

DE SOUZA JM. *et al.* Malária. Doenças Infecciosas e Parasitárias: enfoque Amazônico. Belém, Cejup, p.645-669, 1997.

DESJARDINS et al. Avaliação quantitativa da atividade inflamatória in vitro por uma técnica de microdiluição semiautomática. Antimicrobiano, v.16, p. 710-718.

DEJIE, L. *et al.* Shikonin exerts anti-inflammatory effects in a murine model of lipopolysaccharide-induced acute lung injury by inhibiting the nuclear factor-kappaB signaling pathway. International Immunopharmacology, v.16, p.475-480, 2013.

DOUGLAS NM. *et al.* Mortality attributable to *Plasmodium vivax* malaria: a clinical audit from Papua, Indonesia. BMC Medicine, v.12, n.1, p. 217, 2014.

DRESSMAN, J.B., REPPAS, C. In vitro-in vivo correlations for lipophilic, poorly water-soluble drugs. European Journal of Pharmaceutical Science, v. 2, p.73, 2000.

DUFFY, J. Epidemics in Colonial América, Louisiana State University Press: Baton Rouge, 1953.

ECKER, A. *et al.* PfCRT and its role in antimalarial drug resistance. Trends Parasitol, v.28, n.11, p.504-14, 2012.

ELABBADI *et al.* Uso da incorporação de etanolamina radioativa em fosfolipídeos para avaliação da atividade antimalárica *in vitro* pela técnica de microdiluição semiautomática. Antimicrobiano, v.36, p. 59-55, 1992.

FAJARDO, F. O. Impaludismo. Rio de Janeiro, Imprensa Nacional, 1904.

FARNERT, A. *et al.* Evidence of *Plasmodium falciparum* malaria resistant to atovaquone and proguanil hydrochloride: case reports. British Medical Journal, v.326, p.628-629, 2003.

FERREIRA, V.F; SILVA, M.N; SOUZA, M.C.B.V. Panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na β - lapachona e derivados. Química Nova, v. 26, n. 3, p. 407-416, 2003.

FONSECA, S.G.C.; BRAGA, R.M.C. E SANTANA, D.P. Lapachol- química, farmacologia e métodos de dosagem. Revista Brasileira de Farmácia, v. 84, n. 1, p. 9-16, 2003.

FREY, S. G. *et al.* Artesunate-mefloquine combination therapy in acute *Plasmodium falciparum* malaria in young children: A field study regarding neurological and neuropsychiatric safety. Malaria Journal, 2010.

FRY, M; PUDNEY, M. Site of action of the antimalarial hydroxynaphthoquinone, 2-[trans-4-(4'-chlorophenyl) cyclohexyl]-3-hydroxy-1, 4-naphthoquinone. Biochemical pharmacology, v.43, n.7, p.1545-1553, 1992.

GARCIA-BUSTOS, J.F; GAMO, F.J. Antimalarial Drug resistance and early drug Discovery. Current pharmaceutical design, v.19, n.22, p. 270-281, 2013.

GARDNER, M.J. *et al.* Genome sequence of the human malária parasite *Plasmodium falciparum*. Nature, v.419, p.498-511, 2002.

GETHING PW. *et al.* A long neglected world malaria map: *Plasmodium vivax* endemicity in 2010. PLoS Neglected Tropical Diseases, v.6, n.9, p.1814, 2012.

GELB, MH. Descoberta de medicamentos para a malária: um esforço muito desafiador e oportuno. Quimical Biology, v.11, p. 440-445, 2007.

GILSON, R.C. *et al.* Growth of *Plasmodium falciparum* in response to a rotating magnetic field. Malaria Journal, v.17, p.190, 2018.

GOLENSER, J. *et al.* Current perspectives on the mechanism of action of artemisinins. The International Journal for Parasitology, v.36, p.1427– 1441, 2006.

GOMES AP. Malária grave. Jornal Brasileiro de Medicina, v.79, n.5/6, p.68-76, 2000.

GUANTAI, E. M. *et al.* Design, synthesis and in vitro antimalarial evaluation of triazole-linked chalcone and dienone hybrid compounds. Bioorganic Medicine Chemistry, v.18, p. 8243, 2010.

GUEIRARD, P. *et al.* Development of the malaria parasite in the skin of the mammalian host. Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 107, n. 43, p. 18640- 18645, 2010.

GUIMARAES, TT. *et al.* European Journal of Medicinal Chemistry, v.63, p.523, 2013.

HESS F.I. *et al.* Anti-malarial drug resistance, malnutrition and socio-economic status. Tropical Medicine & International Health; v. 2, n.8, p. 721-728, 1997.

IBIS, C. *et al.* Synthesis of novel 1,4-naphthoquinone derivatives: antibacterial and antifungal agents. Medicinal Chemistry Research, v.22, p.2879-2888, 2013

JANA S; PALIWAL J. Novel molecular targets for antimalarial chemotherapy. International Journal of antimicrobial Agents, v. 30, n.1, p.4-10, 2007.

JARDIM, G. A. M. *et al.* Naphthoquinone-based chalcone hybrids and derivatives: synthesis and potent activity against cancer cell lines. Medicinal Chemistry Communications, v. 6, p.120-130, 2015.

KARALAI, C. *et al.* Naphthalene derivatives from *Dyospiros wallichii*. Canadian Journal of Chemistry, v. 88, n. 9, p. 922-927, 2010.

KISHORE, N. *et al.* Cytotoxicity 181 of synthesized 1,4-naphthoquinone analogues on selected human cancer cell lines. Bioorganic & Medicinal Chemistry, v.22, p.5013-5019, 2014.

KLAYMAN DL. Qinghaosu (artemisinin): an antimalarial drug from China. Science, v.228, p. 1049-1055, 1985.

KOROLKOVAS, A. & BURCKHALTER, J. H. - Química Farmacêutica, Guanabara Dois, Rio de Janeiro, RJ, 1982.

KROGSTAD, D. J. *et al.* Energy dependence of chloroquine accumulation and chloroquine efflux in *Plasmodium falciparum*. Biochemical Pharmacology, v. 43, n. 1, p. 57-62, 1992.

LAURIA, A. *et al.* European Journal of Organic Chemistry, p. 3289–3306, 2014.

LEE, M.R. Plants against malaria Part 1: Chinchona or Peruvian Bark. J. R. Physicians Edinb, v.32, p.189-96, 2002.

LEE, Y. J. *et al.* Molecular Mechanism of SAHA on regulation of autophagic cell death in tamoxifen-resistant MCF-7 breast cancer cells. International Journal of Medical Sciences, v. 9, n. 10, p. 881-893, 2012.

LI, Y.; WU, Y.L. How chinese scientists discovered qinghaosu (artemisinin) and developed its derivatives? What are the future perspectives? Medicina Tropical, v.58, p. 9-12, 1998.

LOOAREESUWAN, S.; CHULAY, J. Malarone (atovaquone and proguanil hydrochloride): a review of its clinical development for treatment of malaria. The American Journal of Medicine and Hygiene, v.60, p.533-541, 1999.

MALLAVADHANI, U. V. *et al.* Synthesis and anticancer activity of some novel 5,6-fused hybrids of juglone based 1,4-naphthoquinones. European Journal of Medicinal Chemistry, v.83, p.84-91, 2014.

MARTINS COSTA, D.A. A malária e suas diversas modalidades clínicas. Rio de Janeiro. 1885.

MASKLER, MT; HINRICHS, DJ. Medição da atividade de lactato desidrogenase de *Plasmodium falciparum* como avaliação da parasitemia. Tropical Medicine, v.48, p. 205-210, 1993.

MESHNICK, S. R. Artemisinin: mechanisms of action, resistance and toxicity. The International Journal of Parasitology, v. 32, p. 1655-1660, 2002.

MILLER, L. H. *et al.* Malaria biology and disease pathogenesis: insights for new treatments. Nature Medicine, v. 19, n. 2, p. 156-67, 2013.

MILNER, DA. *et al.* A histological method for quantifying *Plasmodium falciparum* in the brain in fatal paediatric cerebral malaria. Malaria Journal, v.12, p. 191, 2013.

NAUJORKS, A. A. S. *et al.* Novel naphthoquinone derivatives and evaluation of their trypanocidal and leishmanicidal activities. Organic & Biomolecular Chemistry, v. 13, p.428-437, 2015.

NOEDL, H. *et al.* Evidência de malária resistente à artemisinina no oeste do Camboja. Journal of Medicine, v. 359, p.2519-2620, 2008.

NG OT. *et al.* Naturally acquired human Plasmodium knowlesi infection, Singapore. Emerging Infectious Diseases, v.14, p.814-816, 2008.

O'BRIEN, P. J. Molecular mechanisms of quinone cytotoxicity. Chemical Biological Interactions, v.80, n.1, p. 1-41, 1991.

OLIVEIRA, A.B. *et al.* Estrutura química e atividade biológica de naftoquinonas de Bignoniáceas brasileiras. Química Nova, v.13, n.4, p. 302-307, 1990.

OLLIARO, P. Mode of action and mechanisms of resistance for antimalarial drugs. Pharmacology & Therapeutics, v.89, p. 207–219, 2001.

PATERNO, E. Ricerche Sull Acido Lapacico. Gazzetta Chimica Italiana, v. 12, p.337-392, 1882.

PEDROSA, M. O. *et al.* Hybrid Compounds as Direct Multitarget Ligands: A Review. Current Medicinal Chemistry, v. 17, p. 1044-1079, 2017.

PEIXOTO, A. "O problema sanitário da Amazônia", v. 1, p. 179-203. 1917.

PEIXOTO, H. M.; MARCHESINI, P. B.; DE OLIVEIRA, M. R. F. Efficacy and safety of artesunate-mefloquine therapy for treating uncomplicated Plasmodium falciparum malaria: systematic review and meta-analysis. Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 2016.

PETERS, W. The prevention of antimalarial drug resistance. Pharmacology & Therapy, v.47, p. 499-508, 1990.

PHIMPRAPHI, W. *et al.* Longitudinal study of Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax in a Karen population in Thailand. Malaria Journal, v. 7, n. 1, p. 99, 2008.

PINA – COSTA, A. *et al.* Malaria in Brazil: what happens outside the Amazonian endemic region. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v.109, n. 5, p. 618-633, 2014.

PINTO, A. V.; CASTRO, S. L. The trypanocidal activity of naphthoquinones: a review. Molecules, v. 14, p. 4570-4590, 2009.

RAHMOUN, N. M. *et al.* Antibacterial and antifungal activity of lawsone and novel naphthoquinone derivatives. Médecine et maladies infectieuses, v. 42, p. 270-275, 2012.

RIECKMANN *et al.* Efeitos da cloroquina, quinina e cicloguanil a maturação de formas eritrocíticas assexuadas de duas cepas de *Plasmodium falciparum* *in vitro*. Tropical Medicine, v.17, p.661-671, 1968.

ROBERT, A. *et al.* From classical antimalarial drugs to new compounds based on the mechanism of action of artemisinin. Pure and Applied Chemistry, v.73, p. 1173-1188, 2001.

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

RUSSEL, P. F.; Bulletin of the New York Academy of Medicine, v. 44, p.623, 1968.

SEVERINI, C., MENEGON, M. Resistance to antimalarial drugs: An endless world war against Plasmodium that we risk losing. Journal of Global Antimicrobial Resistance, v.3, p. 58–63, 2015.

SHERMAN, IW. Transporte de aminoácidos e precursores de ácidos nucleicos em parasitas da malária, v. 55, p-211-225, 1977.

SILVA, M., FERREIRA, V., DE SOUZA, M., Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na β -lapachona e derivados. Química Nova, v. 26, p. 407-416, 2003.

SILVA, R. D.; HOCHMAN, G. Um método chamado Pinotti: sal medicamentoso, malária e saúde internacional (1952-1960). História, Ciências, Saúde-Manguinhos, v. 18, p. 519-544, 2011.

SILVA, T. H. A. *et al.* Química Nova, v. 28, p. 244, 2005.

SILVIE, O. *et al.* Alternative invasion pathways for plasmodium berghei sporozoites. International Journal for Parasitology, v. 37, n. 2, p. 173-182, 2007.

SILVINO, A. C. R. *et al.* Variation in Human Cytochrome P-450 drug-metabolism genes: A gateway to the understanding of plasmodium vivax relapses. PLoS ONE, 2016.

SINGH, B.; DANESHVAR, C. Human infections and detection of Plasmodium knowlesi. Clinical Microbiology Reviews, v. 26, n. 2, p.165-184, 2013.

SINKA, M.E. *et al.* A global map of dominant malaria vectors. Parasites & Vectors, v. 5, n. 69, 2012.

SIQUEIRAAM. *et al.* Characterization of Plasmodium vivax-associated admissions to reference hospitals in Brazil and India. BMC Medicine, v. 13, n. 1, p. 57, 2015.

SONKO ST. *et al.* Does socio-economic status explain the differentials in malaria parasite prevalence? Evidence from The Gambia. Malaria Journal, v.13, n. 1, p. 449, 2014..

SPEERS DJ. *et al.* Diagnosis of malaria aided by polymerase chain reaction in two cases with low-level parasitaemia. Internal Medicine, v.33, n.12, p. 613- 615, 2003.

SRIVASTAVA, I.K; ROTTENBERG, H; VAIDYA, A.B. Atovaquone, a broad spectrum antiparasitic drug, collapses mitochondrial membrane potential in a malarial parasite. Journal of Biological Chemistry, v.272, n.7, p. 3961-3966, 1997.

STANLEY. *et al.* Malaria – Obstacles and opportunities - A report of the Committee for the Study on Malarial Prevention and Control: Status Review and Alternative Strategies, Division of International Health, Institute of Medicine, National Academy Press: Washington D.C., 1991.

TARUN, A.S. *et al.* Quantitative isolation and in vivo imaging of malaria parasite liver stages. International Journal for Parasitology, v. 36, p. 1283-1293, 2006.

THOMSON, R.H. Distribution of naturally occurring quinones. Pharmaceutisch Weekblad Scientific Edition, v.13, n.2, p. 70-73, 1991.

TJITRA E. *et al.* Multidrug-resistant Plasmodium vivax associated with severe and fatal malaria: a prospective study in Papua, Indonesia. PLoS Med, v. 5, n.6, p.128, 2008.

VALE, N; MOREIRA, R; GOMES, P. Quimioterapia da malária: um século no desenvolvimento de antimaláricos. Química, n.99, p.57-69, 2005.

VIANEN *et al.* Triagem por citometria de fluxo de amostras de sangue para parasitas da malária. Citometria, v.14, p.276-280, 1993.

VIEGAS-JUNIOR, C *et al.*, Molecular Hybridization: A Useful Tool in the Design of New Drug Prototypes. Current Medicinal Chemistry, v.14, n.17, p.1829-1852, 2007.

WARSAME, M. *et al.* Role of medicines in malária control and elimination. Drug Development Research, v.71, n.1, p.4-11, 2010.

WERNSDORFER WH. The development and spread of drug-resistant malaria. Parasitol Today, v. 7, p. 297-303, 1991.

WHITE, N. J. 1999. Delaying antimalarial drug resistance with combination chemotherapy. Parassitologia, v.41, n 1-3, p. 301-308, 1999.

WHITE, N. J. Qinghaosu (artemisinin): the price of success. Science, v. 320, n. 5874, p.330-334, 2008.

WHITE, N.J.*et al.* Malaria. Lancet, v. 383, p. 723-735, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. World Malaria report 2014. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, p. 36-37, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. World malaria report 2017: World Health Organization, 2017.

WRIGHT CW. Traditional antimalarial and the development of novel antimalarial drugs. Journal of Ethnopharmacol, v.100, p. 67-71, 2005.

YUAN-QIANG HU. *et al.* Quinoline hybrids and their antiplasmodial and antimalarial activities. European Journal of Medicinal Chemistry, v.139, p. 22-47, 2017.

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Título do Projeto de Pesquisa: Investigação de novos compostos a base de naftoquinonas contra o *Plasmodium falciparum* como estratégia terapêutica no controle da malária.

Coordenadora: Laryssa Kathleen Mendonça Ferreira
Colaboradoras: Lílian Maria Lapa Montenegro Pimentel
Haiana Charifker Schindler
Renata Maria Costa Souza

Convidamos o Senhor (a) para participar como voluntário do projeto de pesquisa “Investigação de novos compostos a base de naftoquinonas contra o Plasmodium falciparum como estratégia terapêutica no controle da malária”, que será desenvolvido no Instituto Aggeu Magalhães, uma unidade da Fundação Oswaldo Cruz, localizada em Pernambuco (IAM/FIOCRUZ).

Objetivo da pesquisa: A resistência do parasita causador da malária às drogas, utilizadas no tratamento em monoterapia, é um problema crescente na quimioterapia da malária. Essa pesquisa pretende, portanto, obter um candidato a nova droga de uso clínico para o tratamento da malária.

Benefício: Caso aceite participar, o (a) senhor (a) irá contribuir para o desenvolvimento do projeto na parte biológica e será feita uma coleta do seu sangue na veia do braço. A coleta de sangue na veia do braço será feita com uma agulha nova e descartável e um tubo de vidro novo. A quantidade de sangue a ser retirada será de 4ml e será feita pela coordenadora ou por uma das colaboradoras que trabalham nessa pesquisa. Através da coleta do seu sangue nós iremos avaliar se os compostos a serem testados serão promissores ou não para o tratamento da doença.

Risco e/ou desconfortos: A coleta de sangue é segura, mas pode causar algum desconforto quando a agulha entrar na pele. Pode também sair um pouco de sangue e ficar uma mancha roxa no lugar onde a agulha entrou, mas isso não tem nenhum risco para a sua saúde.

(Rúbrica do participante da pesquisa)

(Rúbrica da Coordenadora)

Todas as informações e explicações serão fornecidas pelo pesquisador e qualquer alteração deverá ser comunicada ao pessoal responsável que verificará a necessidade de cuidados adicionais. O (A) senhor (a) só vai participar da pesquisa se tiver vontade. Caso aceite participar da pesquisa, o (a) senhor (a) não estará obrigado a ficar até o final, pode desistir a qualquer momento, sem nenhum problema. A sua participação será sem receber qualquer incentivo financeiro ou ter qualquer despesa e com a finalidade exclusiva de colaborar para o sucesso da pesquisa.

Sigilo e confidencialidade das informações: Ninguém vai saber que o(a) senhor(a) está participando deste estudo. Nós não vamos falar com as outras pessoas, nem vamos dar a estranhos as informações que o (a) senhor

(a) nos der. Os resultados da pesquisa serão colocados em revistas científicas e apresentados em eventos científicos, mas sem identificar nenhuma pessoa que participou da pesquisa.

A sua participação será sem receber qualquer incentivo financeiro ou ter qualquer despesa e caso haja será ressarcido e possui a finalidade exclusiva de colaborar para o sucesso da pesquisa. Caso precise de algum esclarecimento, entrar em contato a qualquer momento que julgar necessário com a coordenadora Laryssa Kathleen Mendonça Ferreira, e as colaboradoras Renata Maria Costa Souza, Dra. Lílian Maria Lapa Montenegro Pimentel e Dra. Haiana Charifker Schindler, através do telefone (81) 2101-2569 ou dos e-mails: laryssakathleen@outlook.com, renata755@hotmail.com, lilian@cpqam.fiocruz.br.

Em caso de dúvidas ou preocupações quanto aos seus direitos como participante deste estudo, o (a) senhor (a) pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) deste centro de pesquisas, localizado na Av. Professor Moraes Rego, s/n - Campus da UFPE - Cidade Universitária, Recife/PE, CEP: 50.670- 420, através do telefone (81) 2101-2639 ou pelo e-mail: comiteetica@cpqam.fiocruz.br. O horário de funcionamento é das 8 – 12 h e das 13 – 17h. O CEP é responsável pela avaliação e acompanhamento dos aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos.

Eu, _____ aceito participar da pesquisa “Investigação de novos compostos a base de naftoquinonas contra o *Plasmodium falciparum* como estratégia terapêutica no controle da malária” e concordo com os procedimentos descritos acima sejam realizados em minha pessoa. Atesto que assinei duas vias do termo de consentimento com informações iguais e fiquei com uma via.

Recife, ____ de ____ de ____.

(Assinatura do participante da pesquisa)

Nome do participante: _____

(Assinatura da Coordenadora)

Nome da Coordenadora: _____

OBS: O Termo de Consentimento será emitido em duas vias, uma para o paciente e outra para o pesquisador. Todas as páginas devem ser rubricadas e numerada

Em caso de dúvidas, você pode procurar a coordenadora: Laryssa Kathleen Mendonça Ferreira, e as colaboradoras Renata Maria Costa Sousa, Dra Lílian Maria Lapa Montenegro Pimentel e Dra Haiana Charifker Schindler, no Instituto Aggeu Magalhães – FIOCRUZ- PE. Av. Profº Moraes Rego, S/N. Campus da UFPE. Recife/PE.

E-mail: laryssakathleen@outlook.com

renata755@hotmail.com

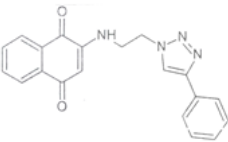
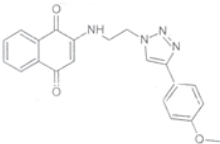
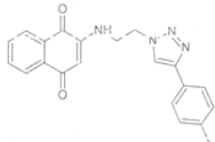
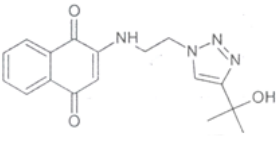
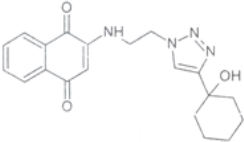
lilian@cpqam.fiocruz.br

Telefone: 81 2101-2569

ANEXO A – SÍNTESE DOS COMPOSTOS 2- AMINO- 1,4-NAFTOQUINONAS COM ANEL 1,2,3 TRIAZÓLICO

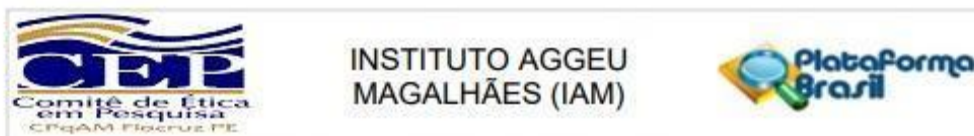
A Síntese e a identificação estrutural dos derivados híbridos da naftoquinona e do triazol foram realizadas no Laboratório de Síntese de Compostos Bioativos da Universidade Federal Rural de Pernambuco (URFPE) (RONALDO et al., 2017). Foram sintetizados um total de 5 compostos (Tabela 4).

Tabela 4. Fórmula estrutural e molecular dos compostos 83, 84, 85, 87, 88.

Código	Fórmula Estrutural	Fórmula Molecular Massa molecular
83		C ₂₀ H ₁₆ N ₄ O ₂ 344,37 g/mol
84		C ₂₁ H ₁₈ N ₄ O ₃ 374,30 g/mol
85		C ₂₁ H ₁₈ N ₄ O ₂ 358,39 g/mol
87		C ₁₇ H ₁₈ N ₄ O ₃ 326,35 g/mol
88		C ₂₀ H ₂₂ N ₄ O ₃ 366,41 g/mol

Fonte. Elaborada pela autora, 2019.

ANEXO B – PARECER DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Investigação de novos compostos a base de naftoquinonas contra o *Plasmodium falciparum* como estratégia terapêutica no controle da malária.

Pesquisador: LARYSSA KATHLEEN

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 30756820.6.0000.5190

Instituição Proponente: FIOCRUZ - Instituto Aggeu Magalhães (IAM)

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.150.785

Apresentação do Projeto:

Os fármacos atualmente utilizados na quimioterapia da malária adotam a utilização de associações medicamentosas de compostos 4- e 8-aminoquinolínicos sintéticos, como mefloquina e primaquina, com derivados endoperóxidossemi-sintéticos da artemisinina: o arteméter, o arteeter e o artesunato. A resistência do *Plasmodium* as drogas é um problema significativo, tornando urgente a busca de novas classes de quimioterápicos capazes de combater o parasito causador da doença. O objetivo principal deste trabalho é investigar novos compostos derivados da 1,4-naftoquinonas contendo o anel 1,2,3-triazólico contra o *Plasmodium falciparum* como possíveis candidatos a nova droga de uso clínico para o tratamento da malária. Esses candidatos a novos fármacos serão testados frente as cepas sensível e resistente do *P. falciparum* através da avaliação da ação antimalárica *in vitro*, ação citotóxica, e entre outras, a fim de selecionar um composto ativo. Vale ressaltar que todos os ensaios serão realizados *in vitro* com as moléculas candidata a fármacos, com linhagens celulares e com eritrócitos humanos. A partir dos resultados obtidos através do presente projeto, espera-se identificar pelo menos um novo agente terapêutico antimalárico eficaz, que possua ou baixa ou nenhuma toxicidade e efeitos adversos, o qual seja considerado um bom candidato a fármaco, e possa ser submetido a ensaios clínicos em humanos.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, s/nº
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.670-420
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2101-2639 **Fax:** (81)2101-2639 **E-mail:** comiteetica@cpqam.fiocruz.br



INSTITUTO AGGEU
MAGALHÃES (IAM)



Continuação do Parecer: 4.150.785

Investigar um novo composto derivados da 1,4-naftoquinonas contendo o anel 1,2,3-triazólico contra o *P. falciparum* como candidato a nova droga de uso clínico para o tratamento da malária.

Objetivo Secundário:

- Determinar o potencial antimalárico in vitro dos novos compostos frente a cepas W2 (cloroquina-resistente) e a 3D7 (cloroquina-sensível);
- Avaliar a ação citotóxica dos novos compostos;
- Avaliar a capacidade hemolítica dos novos compostos in vitro;
- Avaliar possíveis alterações morfológicas no *Plasmodium* induzidas pelos compostos teste.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

A coleta de sangue é segura, pode causar apenas um desconforto quando a agulha entrar na pele. Pode também sair um pouco de sangue e ficar uma mancha roxa no lugar onde a agulha entrou, mas isso não tem nenhum risco para a sua saúde.

Benefícios:

Através da coleta do sangue do participante, o grupo irá avaliar se os compostos a serem testados serão promissores ou não para o tratamento da malária.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A participação humana será pela doação de 4 mL de sangue para o teste de hemólise. Serão necessários 20 voluntários (5 de cada grupo sanguíneo: O, A, AB e B), que serão divididos em 4 grupos de acordo com os seus respectivos grupos sanguíneos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos entregues sem pendências.

Recomendações:

Entregas de relatórios parciais e final devem ser feitas via notificação. Os relatórios parciais devem ser apresentados, pelo menos, semestralmente. Qualquer alteração no protocolo no decorrer da pesquisa, como também mudança de equipe, devem ser informados via emenda. Todas as ações deve ser realizadas via Plataforma Brasil.

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, s/nº
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.670-420
 UF: PE Município: RECIFE
 Telefone: (81)2101-2639 Fax: (81)2101-2639 E-mail: comiteetica@cpqam.fiocruz.br



INSTITUTO AGGEU
MAGALHÃES (IAM)



Continuação do Parecer: 4.150.785

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Todas as pendências do parecer de número 4.018.800 foram atendidas nessa última versão.

O Comitê avaliou e considera que os procedimentos metodológicos do Projeto em questão estão condizentes com a conduta ética que deve nortear pesquisas envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde, de 12 de dezembro de 2012 e complementares.

O projeto está aprovado para ser realizado em sua última formatação apresentada ao CEP.

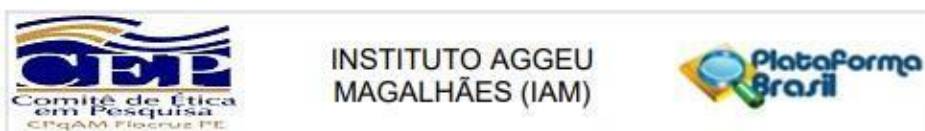
Considerações Finais a critério do CEP:

Vale ressaltar que, em relação ao protocolo de pesquisa, é previsto na Resolução 466/2012 no item XI - DO PESQUISADOR RESPONSÁVEL, que o pesquisador deve apresentar ao CEP relatórios parciais e finais (subitem: d) elaborar e apresentar os relatórios parciais e final). Pede-se que o pesquisador entregue os relatórios como previsto no texto da resolução. Informamos que a entrega dos relatórios parciais precisam ser feitas a cada semestre, conforme cronograma de execução da pesquisa, via Plataforma Brasil.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1532899.pdf	09/06/2020 11:38:34		Aceito
Outros	Carta_de_Resposta_as_Pendencias.pdf	09/06/2020 11:36:17	LARYSSA KATHLEEN	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_LaryssaKathleen.pdf	09/06/2020 11:34:03	LARYSSA KATHLEEN	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_.pdf	09/06/2020 11:29:58	LARYSSA KATHLEEN	Aceito
Outros	Declaracao_compromisso.pdf	03/04/2020 19:02:10	LARYSSA KATHLEEN	Aceito
Declaração de concordância	Concordancia_.pdf	03/04/2020 18:33:57	LARYSSA KATHLEEN	Aceito
Outros	Curriculo_Renata.pdf	03/04/2020 17:35:24	LARYSSA KATHLEEN	Aceito
Outros	Curriculo_Lilian_Pimentel.pdf	03/04/2020	LARYSSA	Aceito

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, s/nº
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.670-420
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2101-2639 **Fax:** (81)2101-2639 **E-mail:** comiteetica@cpqam.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 4.150.785

Outros	Curriculo_Lilian_Pimentel.pdf	17:35:01	LARYSSA	Aceito
Outros	Curriculo_Laryssa.pdf	03/04/2020 17:34:39	LARYSSA KATHLEEN	Aceito
Outros	Curriculo_Haiana.pdf	03/04/2020 17:33:09	LARYSSA KATHLEEN	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto.PDF	03/04/2020 15:18:43	LARYSSA KATHLEEN	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RECIFE, 13 de Julho de 2020

Assinado por:
Maria Almerice Lopes da Silva
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, s/nº
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.670-420
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2101-2639 **Fax:** (81)2101-2639 **E-mail:** comiteetica@cpqam.fiocruz.br