



Universidade Federal de São João del-Rei
Coordenadoria do Curso de Química



Malária: Aspectos históricos e utilização da Artemisinina em seu tratamento

Edna Ferreira Amaral

São João del-Rei – 2015

MALÁRIA: ASPECTOS HISTÓRICOS E UTILIZAÇÃO DA ARTEMISININA EM SEU TRATAMENTO

Monografia de Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado no segundo semestre do ano de 2015 ao Curso de Química, Grau Acadêmico Bacharelado, da Universidade Federal de São João del-Rei, como requisito parcial para obtenção do título Bacharel em Química.

Autor: Edna Ferreira Amaral

Docente Orientador: Prof.^a Dr.^a Luciana Guimarães

Modalidade do Trabalho: Revisão bibliográfica

São João del-Rei – 2015

RESUMO:

A malária é uma doença parasitária causada pela presença do parasita *Plasmodium* nas células vermelhas do sangue, cujos relatos históricos indicam manifestações da doença desde a Antiguidade em povos egípcios e chineses. As principais espécies do protozoário existentes até hoje já circulavam naquela época, entre eles *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium vivax* e o *Plasmodium falciparum*, sendo o mosquito fêmea *Anopheles* o responsável pela transmissão da doença. Diante do sofrimento das pessoas com as febres intermitentes, pesquisas em busca de maior compreensão da malária já eram realizadas. Dentre os pesquisadores que contribuíram na área, podemos destacar Ronald Ross, que descobriu o gênero causador da malária em 1898. Desde então, diversos esforços se voltaram para a cura de pessoas infectadas. Inicialmente, a quinina foi o fármaco utilizado para o tratamento. Porém, devido ao desenvolvimento de resistência a quinina pelo parasita, outras substâncias passaram a ser utilizadas e o uso dela na terapia da malária foi suspenso. A artemisinina, por exemplo, foi descoberta após a Guerra dos Estados Unidos contra o Vietnã, pelo grupo de pesquisa de Youyou Tu, que conseguiu preparar um extrato ativo, a partir da planta *Artemisia annua*, eficaz no tratamento da malária. Atualmente, a artemisinina é empregada como uma terapia baseada em combinação de artemisinina (ACT), a fim de impedir o surgimento de resistência pelas diferentes espécies do parasita. O mecanismo de ação da artemisinina é complexo, porém estudos afirmam que ela é ativada pelo íon ferroso (Fe^{2+}) presente no grupo heme da hemoglobina formando radicais livres, com a função de impedir a desintoxicação do heme no interior do parasita. Nesta revisão, serão apresentados os aspectos históricos sobre a malária e descoberta da artemisinina, bem como o ciclo biológico do parasita em humanos e a resistência que ele vem desenvolvendo aos fármacos usados no tratamento. As diferentes propostas de mecanismo de ação da artemisinina serão abordadas, destacando suas diferentes possibilidades de ação, como cisão redutiva, abertura do anel endoperóxido, ou interação com enzimas do *Plasmodium*.

SUMÁRIO

1.Introdução	1
1.1 - Aspectos Históricos da Malária	1
1.2 - Aspectos históricos do tratamento da Malária	3
1.3 - Aspectos históricos sobre a Artemisinina	6
1.4 - Artemisinina: Destaque no prêmio Nobel 2015 de Medicina	9
2. Ciclo biológico do parasita em humanos	9
3. Resistência ao uso de fármacos no tratamento da malária	13
4. Mecanismo de ação da artemisinina	16
4.1 - Interação entre o grupo heme e a artemisinina	17
4.2 - Formação de radicais centrados em carbono e em oxigênio	18
4.3 - Receptor PfATP6	22
4.4 - Enzima Cisteíno-Protease	24
5. Considerações Finais	25
6. Referências Bibliográficas	26

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos históricos da Malária

A malária é uma doença parasitária infecciosa, causada por protozoários do gênero *Plasmodium* que se multiplicam nos eritrócitos (células vermelhas do sangue) do hospedeiro, sendo transmitida pelo mosquito fêmea do gênero *Anopheles*. A malária é conhecida desde a Antiguidade por povos egípcios e chineses (Camargo, 2003). Os colonizadores europeus quando percorriam a América trouxeram consigo as espécies, *Plasmodium malariae* e *Plasmodium vivax*. E a espécie *Plasmodium (P.) falciparum*, surgiu juntamente com a importação de escravos da África para o continente americano, a partir de 1620 (Leite *et al.*, 2013). Dessa forma, acredita-se que a malária surgiu na América durante o tráfico de escravos africanos em porões de navios negreiros, com a finalidade de exportar mão de obra escrava para plantações no Brasil e demais países do continente.

Em 400 a.C. o fisiologista Hipócrates foi o primeiro a detalhar as febres intermitentes da malária e associar a doença com o meio ambiente, afirmando que as febres eram registradas em regiões pantanosas. Os romanos se tornaram pioneiros na drenagem de pântanos. Por certo tempo, a doença passou a ser descrita como *ária cattiva* ou *mal' ária* (ar ruim) pelos italianos no século XIV, e dessa forma, acreditavam que as pessoas iriam se contaminar ao respirar o mau cheiro dos pântanos. Posteriormente, os franceses passaram a referir-se à malária pelo termo “paludismo”, cujo significado é pântano (França *et al.*, 2008). Essas pessoas ainda não sabiam a respeito da transmissão da malária, haviam apenas hipóteses.

Diversas pessoas que marcaram a história sofreram com as febres intermitentes, dentre os quais, Santo Agostinho, falecido em 597 a.C. e o poeta italiano, Dante Alighieri que morreu em 1321 d.C. da mesma causa. Em contrapartida, Pedro o grande acreditava que o consumo de frutas naquela época causaria a doença, e por isso impediu que seu exército consumisse frutas (França *et al.*, 2008).

Outro dado histórico que destacou a doença foi a morte do imperador Romano Germânico Carlos V no monastério na Espanha em 1558. O Papa Sixtos V faleceu de febre dos pântanos em 1590. Em 1623, 8 cardeais e 30 escribas faleceram de febre ocasionada pela malária (França *et al.*, 2008).

Devido à gravidade da doença, pesquisadores de diversos países, incluindo Itália, Inglaterra e França se empenhavam nos estudos sobre a malária. Dentre eles, Louis

Pasteur (1822-1895) e Robert Koch (1843-1910) com seus estudos microbiológicos foram os pioneiros no desenvolvimento de instrumentos ópticos com a finalidade de realizar testes clínicos. Charles Louis Alphonse Laveran (1845-1922), que inicialmente começou carreira militar como médico e conseguiu caracterizar os parasitas no sangue de pacientes durante as febres intensas da malária. Ele denominou estes organismos de *Oscillaria malariae*, em 1880 (Capana, 2006).

Posteriormente, em 1896 Laveran desistiu de seu trabalho como militar e preferiu dar continuidade aos seus estudos no Instituto Pasteur, onde obteve resultados consistentes, que foram confirmados por pesquisadores posteriores. Já, Ronald Ross (1857-1932) pesquisador nascido na Índia se ingressou no exército como oficial médico (Capana, 2006). Em 1898, Ross descobriu que a Malária era transmitida pela fêmea do mosquito *Anopheles*, impulsionando as pesquisas ao combate à doença, que até então, era voltada apenas a eliminar os parasitas (Olowe *et al.*, 2015).

O termo *Plasmodium* foi proposto por Ettore Marchiafava (1847-1935) e Augusto Celli (1857- 1914) após pesquisas realizadas na Faculdade de Medicina de Roma. No entanto, no início eles afirmavam que a malária era transmitida por uma bactéria denominada *Bacillus malariae*. Após intensos estudos, eles puderam concluir que a doença era transmitida por um protozoário do gênero *Plasmodium* (Capana, 2006).

Posteriormente, Celli e Marchiafava identificaram duas espécies, *P. vivax* e *P. falciparum*, e Camillo Golgi (1843-1926) professor de Patologia Geral da Universidade de Pávia, no norte da Itália, também foi responsável por descobrir *P. vivax* e *P. malariae*. Estas espécies estariam presentes no sangue de dois parasitas responsáveis pelas febres denominadas febres terças e quartãs, que se manifestam de três em três ou quatro em quatro dias, respectivamente (Capana, 2006).

Vale mencionar outro pesquisador que também se destacou na história da doença, Battista Grassi, italiano nascido em Rovellasca, uma cidade rural próximo de Milão (1854-1925). Em 1888, ele iniciou suas pesquisas sobre a transmissão em diferentes espécies de aves. Ao longo de sua carreira, Grassi teve a oportunidade de conhecer um grupo de romanos que realizavam concomitantemente estudos sobre a malária e por meio desta amizade os romanos tentavam convencê-lo de que a transmissão da doença se daria por um inseto. Desde então, Grassi uniu suas pesquisas juntamente com os conhecimentos dos seus amigos zoólogos, afim de investigar três espécies de mosquitos, *Anopheles claviger* e duas espécies *Culex*. Em 1898 Grassi enviou um comunicado à Academia de Lincei, localizada em Roma, que havia infectado três indivíduos sadios com estas três espécies de

mosquitos. Nessa experiência Grassi descreveu todo o ciclo biológico do protozoário do gênero *Plasmodium* no corpo de um mosquito *Anopheles*. E, posteriormente ele afirmou que, seus resultados foram semelhantes aos obtidos por Ross no qual, ele descreveu o ciclo de desenvolvimento do protozoário do gênero *Proteosoma* em *Culex pipiens* no ciclo da malária em aves. (Capana, 2006).

Conforme os fatos históricos mencionados, a malária está entre as doenças com maior registros de morte no mundo e desde a sua descoberta diversos pesquisadores têm se empenhado na descoberta de vacinas, drogas e medidas para prevenção da transmissão da doença (Greenwood *et al.*, 2008).

1.2 Aspectos históricos do tratamento da Malária

O primeiro composto utilizado no tratamento da malária foi a quinina (Figura 1-a), isolada da *Cinchona*, árvore nativa da América Central e do Sul (Barreiro, *et al.*, 2009; Greenwood *et al.*, 2008). A estrutura química da quinina é composta principalmente por um alcalóide (anel heterocíclico contendo nitrogênio com um par de elétrons não-ligante) responsável pela atividade antimalárica da substância (La-Scalea *et al.*, 2007). A quinina foi introduzida no continente europeu em 1658, por intermédio de jesuítas, e após sua descoberta, passou a ser cultivada em diversas colônias europeias. Devido a intensa demanda pela planta, em 1820 Pelletier e Caventou, conseguiram isolar a quinina (Figura 1-a), na École de Pharmacie de Paris (Menegatti *et al.*, 2001).

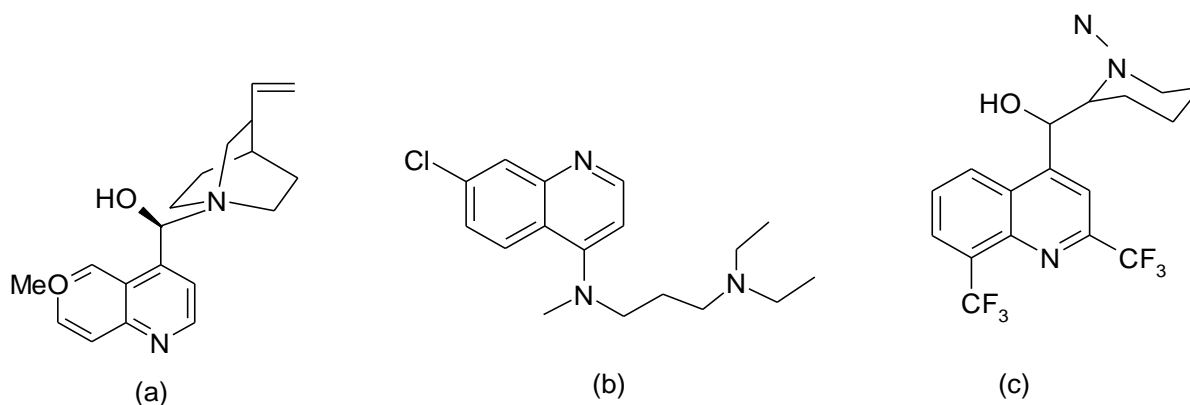


Figura 1 - Estrutura da quinina (a) e seus derivados quinolínicos cloroquina (b) e mefloquina (c)

No século XX, a quinina era utilizada no tratamento da malária, porém com o aparecimento de novas drogas mais eficazes, como artemisinina e seus derivados, seu uso foi suspenso (La-Scalea *et al.*, 2007). A principal característica evidenciada ao uso da

quinina naquela época refere-se ao fato dos parasitas levarem mais tempo para adquirirem resistência à droga (Teixeira *et al.*, 2014).

Em 1945, com o desenvolvimento da indústria de corantes alemã, Woodward e Doering conseguiram obter a quinina sintética, além de diversos compostos heterocíclicos coloridos que possuíam grande papel na indústria daquela época (Menegatti *et al.*, 2001). Na mesma classe química foi possível obter a cloroquina com algumas semelhanças estruturais, dentre elas, o anel heterocíclico (La-Scala *et al.*, 2007).

Atualmente, existem estudos que envolvem a retomada de drogas clássicas, para a terapia no tratamento da malária. As pesquisas se baseiam na síntese de novos fármacos a partir daqueles já existentes, com o propósito de obter novas substâncias que sejam mais eficazes ao tratamento da malária. A quinina (Figura 1-a) por exemplo, tem sido um dos focos de pesquisa, e recentemente, Lambers e colaboradores apresentaram uma modificação no grupo vinil presente na estrutura química da quinina. Esse grupo vinil foi convertido a aldeído, e a partir deste, houve uma aminação redutiva (introdução de um grupo amina na molécula orgânica) ou redução para álcool. Uma pesquisa realizada por Sanders e colaboradores propôs a síntese e o estudo de quatro substâncias sintetizadas a partir da quinina e quinidina. A hidroxietilquinidina (Figura 2) apresentou inibição na cristalização do heme *in vitro*. Essa substância pode ser uma nova classe de antimaláricos à base de quinina, porém é necessário algumas modificações químicas. Apesar das recentes descobertas de derivados de quinina, não foi realizado testes clínicos com os derivados sintéticos de quinina (Teixeira *et al.*, 2014).

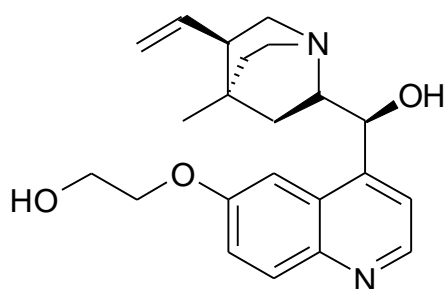


Figura 2 - Estrutura química da hidroxietilquinidina

Devido a busca por substâncias mais eficazes na terapia da malária, atualmente a artemisinina (Figura 3) se tornou uma das drogas mais utilizadas no tratamento da malária cerebral e também contra espécies multirresistentes de *P. falciparum*. Diferentemente das demais drogas existentes para essa finalidade, sua estrutura química é composta por uma ponte endoperóxido (1,2,4-trioxano), essencial para sua atividade antimalárica. No entanto,

terapias de combinação baseadas em artemisinina (ACT) tem sido recomendado pela Organização Mundial da Saúde como tratamento padrão da malária (Capela *et al.*, 2009; O'Neill *et al.*, 2010).

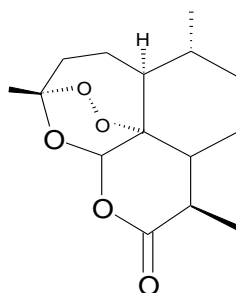
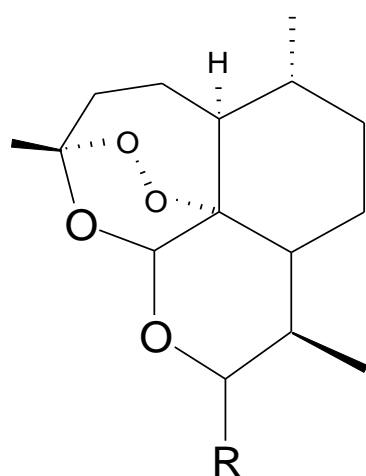


Figura 3 - Estrutura molecular da artemisinina

Mais recentemente, Bell e colaboradores criaram uma junção entre artemisinina e quinina (Figura 1-a), por meio de um derivado de artemisinina, diidroartemisinina (Figura 4-b) e um ácido carboxílico de quinina (Figura 1-a). O método empregado se baseia em uma ligação covalente entre dois compostos farmacológicos distintos, denominado de biterapia covalente. Os testes biológicos confirmaram que a substância obtida por meio deste método possuía uma melhor atividade antimalárica comparada aos compostos isolados, e foi inclusive constatado que, a substância pode amenizar os efeitos colaterais causados pela droga em sua forma isolada. (Teixeira *et al.*, 2014). Alguns pesquisadores observaram que as espécies *Plasmodium* se tornaram resistentes a ação da cloroquina (Figura 1-b), e com isso descobriram que a artemisinina em combinação com outros compostos seria mais eficaz, principalmente para a forma mais letal da doença, a malária cerebral, causada pela espécie *P. falciparum* (Menegatti *et al.*, 2001).



R	Composto
-O	Artemesinina (a)
OH	Diidroartemisinina (b)
OCH ₃	Artemeter (c)
OC ₂ H ₅	Arteeter (d)
OCO(CH ₂) ₂ COONa	Artesunato de sódio (e)

Figura 4 - Estrutura da artemisinina e seus derivados

Com a descoberta da artemisinina diversos casos de malária grave vêm sendo tratados com essa substância. E devido à sua importância na terapia da malária, ao longo deste trabalho serão abordados alguns aspectos referentes à sua descoberta e algumas hipóteses à respeito do seu mecanismo de ação.

1.3 Aspectos históricos sobre a Artemisinina

A artemisinina foi descoberta na China durante a Revolução Cultural em 1967 com o objetivo de ajudar os militares no norte do Vietnã na guerra contra os Estados Unidos (Miller, *et al.*, 2011). Os chineses já utilizavam essa droga há anos em sua medicina tradicional. Porém, quando diversos soldados vietnamitas vieram a óbito com o uso da cloroquina (Figura 2-b), devido a ineficiência dessa substância, a artemisinina passou a ser mais utilizada. Diante dessa causa, pesquisadores chineses se empenhavam na investigação de um remédio que fosse eficaz para a cura da malária (Udaykumar, 2014).

Em 1967, período no qual se iniciou a Revolução Cultural na China, diversos intelectuais incluindo cientistas, eram explorados em campos agrícolas e submetidos a diversas horas de trabalho escravo. Na mesma época, Mao Zedong ordenou aos cientistas a buscarem uma substância para a cura da malária, e a partir de sua iniciativa foi implantado o Projeto 523, no qual mais de 500 pesquisadores de 60 institutos passaram a focar seus estudos na Medicina Tradicional Chinesa, e em produtos químicos sintéticos que apresentassem atividade antimalárica. Diversos pesquisadores buscavam informações com curandeiros sobre suas ervas e suas curas secretas para a febre. Em uma de suas buscas, eles descobriram que a *Artemisia annua L.* ou Quinghao, uma planta mais conhecida como madeira verme, localizada no Sul da Ásia, era utilizada pelos curandeiros rurais como fonte de cura para febre (Udaykumar, 2014).

A princípio, diversos pesquisadores iniciaram um estudo sobre as características químicas da planta. Dentre eles, a professora Youyou Tu que utilizou o método de extração com éter para remover o ácido e obter uma substância neutra, livre de toxicidade (Udaykumar, 2014).

Ao realizar testes em ratos, Youyou Tu observou que a artemisinina (Figura 3) possuía atividade antimalárica (Udaykumar, 2014). Porém, nesse primeiro processo Tu não obteve êxito, e alterou a obtenção do extrato de *Artemisia* utilizando uma temperatura mais baixa a partir das folhas de *Artemisia annua L.*, e durante o processo, ela conseguiu separar o extrato em duas porções, uma que continha uma substância ácida e não possuía atividade antimalárica, e outra neutra com toxicidade reduzida e excelente atividade antimalárica

(Liao, 2009; Miller & Su, 2011). Este último extrato foi testado em ratos infectados com parasitas *P. berghei*, em Outubro de 1971, e nessa experiência ela concluiu que o extrato foi totalmente eficaz contra estes parasitas no sangue (Miller & Su, 2011). Já em humanos infectados por *P. falciparum* e *P. vivax*, os ensaios clínicos demonstraram que o mesmo extrato foi eficaz no combate contra esses parasitas e também contra as febres intermitentes, comparado a cloroquina (Liao, 2009).

As descobertas feitas por Youyou Tu e seu grupo, foram expostas em um evento na China, realizado em 8 de Março de 1972, com o propósito de influenciar as pesquisas dos demais grupos para obterem os cristais puros da artemisinina (Miller & Su, 2011). Após alguns meses dois pesquisadores (Zeyuan Luo, Yunnan do Instituto de Pesquisa de Drogas e Zhangxing Wei, Shandong do Instituto de Medicina Tradicional Chinesa) conseguiram obter os cristais puros a partir da planta, os quais se mostraram ativos aos parasitas da malária (Miller & Su, 2011).

As características químicas da substância ativa da *Artemisia annua L.*, foram obtidas pelo grupo de Youyou Tu por meio da purificação da espécie de estrutura cristalina, com peso molecular de 282 Da (as massas molares de macromoléculas são expressas em unidades de Dalton (Da), ou seja, 1Da = 1g/mol) e fórmula molecular $C_{15}H_{22}O_5$, considerada a principal substância ativa presente na planta. Eles denominaram de “Qinghaosu” (“qinghao” se refere ao nome chinês de *Artemisia annua L.* e “su” elemento básico) (Liao, 2009). Sua estrutura química foi descoberta juntamente com o Instituto de Biofísica da Academia Chinesa de Ciências em 1975, como uma lactona sesquiterpênica (éster cíclico de cinco ou seis membros composta por um hidrocarboneto de fórmula química $C_{15}H_{24}$ – três unidades de isopreno C_5H_8 – um tipo de butadieno substituído), composta por uma ponte endoperóxido responsável pela sua atividade antimalárica (Liao, 2009; Manegatti *et al.*, 2001).

Com a descoberta da planta *Artemisia annua L.*, diversos derivados da artemisinina (Figura 4-a) vêm sendo sintetizados até os dias de hoje, inclusive a diidroartemisinina (Figura 4-b), sendo mais eficiente que a artemisinina (Figura 4-a). Atualmente, a combinação com outra droga antimalárica, como lumefantrina (Figura 5-a) e piperaquina (Figura 5-b), têm obtido resultados positivos, a fim de aumentar a eficácia dessa substância no tratamento da malária (Liao, 2009).

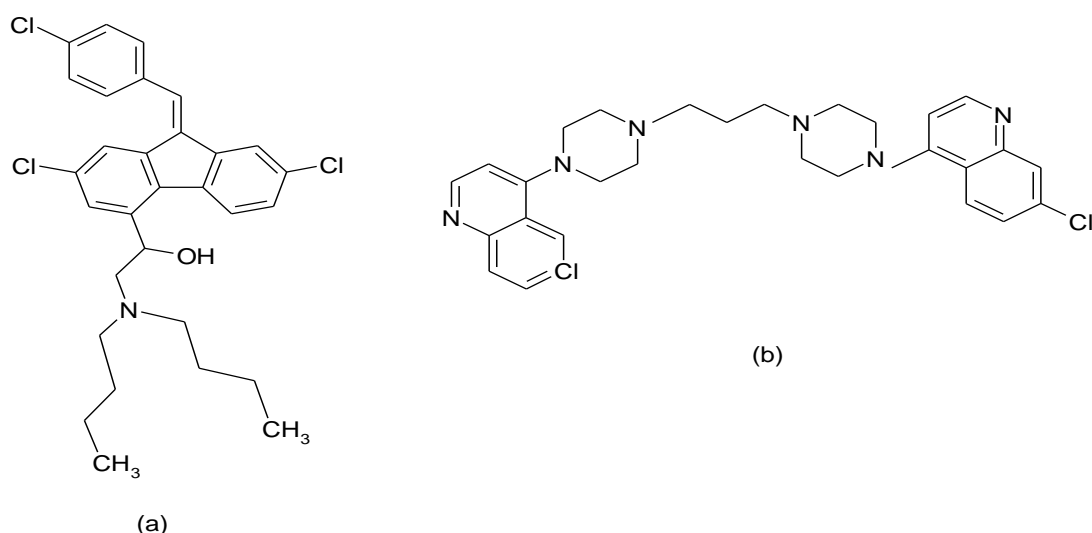


Figura 5 - Estruturas químicas da lumefantrina (a) e piperaquina (b)

Na sequência, o professor Nick White iniciou seus estudos a respeito da atividade antimalárica da artemisinina na Tailândia (Liao, 2009). Ele observou que essa substância possui rápida atividade antimalárica. Entretanto, ele concluiu que seria necessário a combinação de outras drogas para eliminar os parasitas. White foi considerado o pioneiro no tratamento da malária por derivados de artemisinina (Figura 4-a), método que se tornou padrão no mundo inteiro. Nick White foi laureado em 2010 pelo Prêmio Gairdner Canadense pela sua descoberta (Miller & Su, 2011). Este prêmio é dado para cientistas biomédicos que tiveram contribuição para a medicina, afim de tornar mais compreensível a biologia humana e a doença.

O Projeto 523 foi um programa de âmbito nacional secreto que tinha um dos objetivos produzir medicamentos antimaláricos para serem usados no campo de batalha no período da guerra entre Estados Unidos e Vietnã. Por isso, este programa proporcionou uma conquista indiscutível no ramo científico, pois contou com a colaboração de diversos pesquisadores e instituições que se empenharam na busca de uma substância antimalárica. Atualmente, a artemisinina (Figura 4-a) é utilizada em combinação com outras drogas, tais como lumefantrina (Figura 5-a) e piperaquina (Figura 5-b) (Miller & Su, 2011).

Vale salientar que cada medicamento inibe uma parte específica no processo de infecção do hospedeiro. Essas fases serão abordadas com mais detalhes a seguir.

1.4 Artemisinina: destaque no Prêmio Nobel de Medicina de 2015

Conforme mencionado anteriormente, a artemisinina (Figura 4-a) vêm sendo estudada desde 1967 à pedido do governo do Vietnã para combater as intensas manifestações da malária durante a guerra contra os Estados Unidos. E a pesquisadora chinesa Youyou Tu quem liderou às pesquisas juntamente com dois grupos das áreas de fitoquímica e farmacologia. No decorrer de sua descoberta Tu modificou o preparo do extrato da planta *Artemisia annua* afim de obter um produto mais ativo. Após a modificação, foi comprovado que a substância possuía atividade antimalárica altamente eficaz (Owens, 2015).

Atualmente a artemisina é empregada como uma terapia de combinação baseada em artemisinina (ACT), com a finalidade de tornar o tratamento mais eficaz impedindo o surgimento de resistência por espécies parasitas (Owens, 2015).

O motivo pelo qual Tu conquistou o prêmio Nobel de Medicina de 2015 se refere à sua grande colaboração em reduzir os índices de mortalidade em diversos países, principalmente na África onde os dados são alarmantes. Se tratando de números, houve uma diminuição de cerca de 100 mil mortes por ano em áreas endêmicas, de acordo com o Comitê do Nobel (Owens, 2015).

Nesse ponto, a ciência beneficiou as comunidades mais pobres afetadas pela malária ao redor do mundo e tem melhorado significativamente a expectativa de vida de milhares de pessoas, o que não ocorria há 50 anos atrás. (Molyneux *et al.*, 2015).

2. CICLO BIOLÓGICO DO PARASITA EM HUMANOS

O ciclo biológico do parasita da malária engloba dois estágios, a fase sexuada, que ocorre no interior do mosquito *Anopheles* e outra assexuada que ocorre no hospedeiro, conforme mostrado na Figura 6.

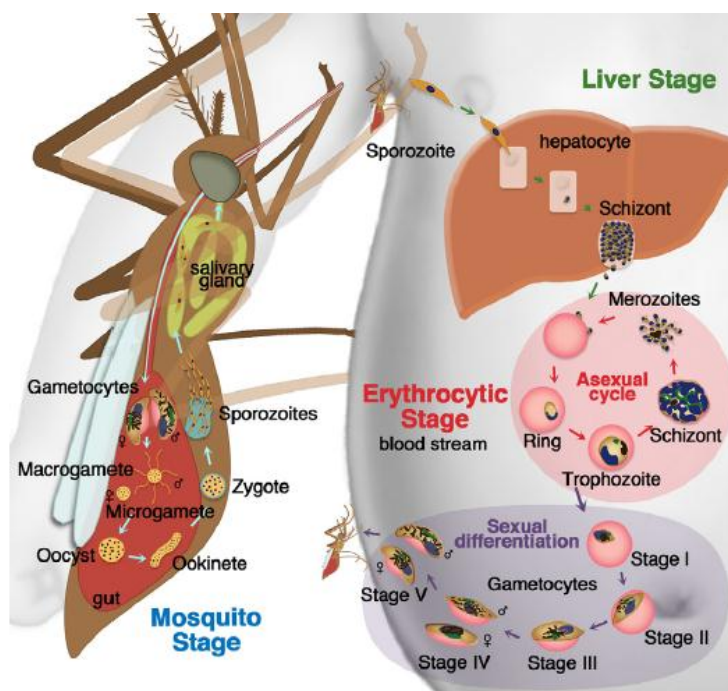


Figura 6- Ciclo biológico das espécies *Plasmodium* em humanos. Figura retirada de (Biamonte et al., 2013)

O primeiro estágio de infecção do parasita da malária se inicia com a picada do mosquito fêmea *Anopheles* liberando diversos esporozoítos para a corrente sanguínea do indivíduo, por meio de suas glândulas salivares. Devido a rapidez do processo, em torno de 30 minutos, as células do fígado (hepatócitos) são atingidas e a quantidade de esporozoítos no sangue se torna inexistente. Os parasitas se desintegram por meio de multiplicação assexuada liberando milhares de merozoítos, e através destes ocorre a eclosão e ruptura das células do fígado. Cada unidade de merozoíto após passar pelo eritrócito (célula do vermelha do sangue) se multiplica em 12 a 16 merozoítos por esquizonte (glóbulo vermelho infectado), ocasionando as febres intermitentes (Biamonte *et al.*, 2013; França *et al.*, 2008). Após o processo de multiplicação assexuada ocorre a formação dos gametócitos feminino e masculino. Estes gametócitos podem ser capturados pelo mosquito quando sugarem o sangue de um hospedeiro infectado. Assim, o mosquito consegue completar seu ciclo biológico. Caso isso aconteça, os gametócitos presentes no intestino do vetor parasita forma um zigoto que regenera outros esporozoítos disponíveis para picada de outro hospedeiro humano (Biamonte *et al.*, 2013).

Os sintomas causados em humanos tais como febres, dores de cabeça e calafrios se devem a ruptura dos eritrócitos infectados nas células do fígado. Além disso, cada merozoíto gerado após a eclosão passa pelos eritrócitos gerando mais esquizonte. Com a multiplicação assexuada, os gametófitos fêmeas (macrogametócitos) e os gametófitos masculinos (microgametócitos) permanecem na corrente sanguínea até serem ingeridos por

outro mosquito *Anopheles*, quando surgir uma nova oportunidade de picada. No interior do intestino delgado do mosquito, após a ingestão, ocorre rapidamente a divisão celular dos gametócitos em 8 microgametas flageladas, e cada um deste se fertilizarão formando os ookinetos (macrogametas fecundados), e na parte exterior formarão os oocistos (cistos). Estes oocistos se romperão formando diversos esporozoítos que migrarão para as células salivares do mosquito disponíveis para infectar outro indivíduo (França *et al.*, 2008).

Existem outras formas de esporozoítos das espécies *P. vivax* e *P. ovale*, denominadas de hipnozoítos, podendo permanecer por vários anos nas células do fígado e provocar os sintomas após anos de transmissão (Biamonte *et al.*, 2013; Cunico *et al.*, 2008).

A maneira utilizada para inibir os estágios de vida do parasita é por meio da utilização de fármacos específicos. Os locais de ação dos fármacos em cada fase de transmissão estão ilustrados na Figura 7. Porém, a prevenção é o mais indicado, principalmente pessoas que pretendem viajar para áreas infectadas ou até moradores de locais com intensa proliferação do mosquito, devem se proteger contra a picada do parasita da malária, usando roupas que cubram boa parte da pele. Além disso, devem utilizar repelentes quando estiverem em locais fechados. Alguns fármacos podem ser utilizados para o tratamento profilático da malária ou para tratar ataques agudos (Rang *et al.*, 2004).

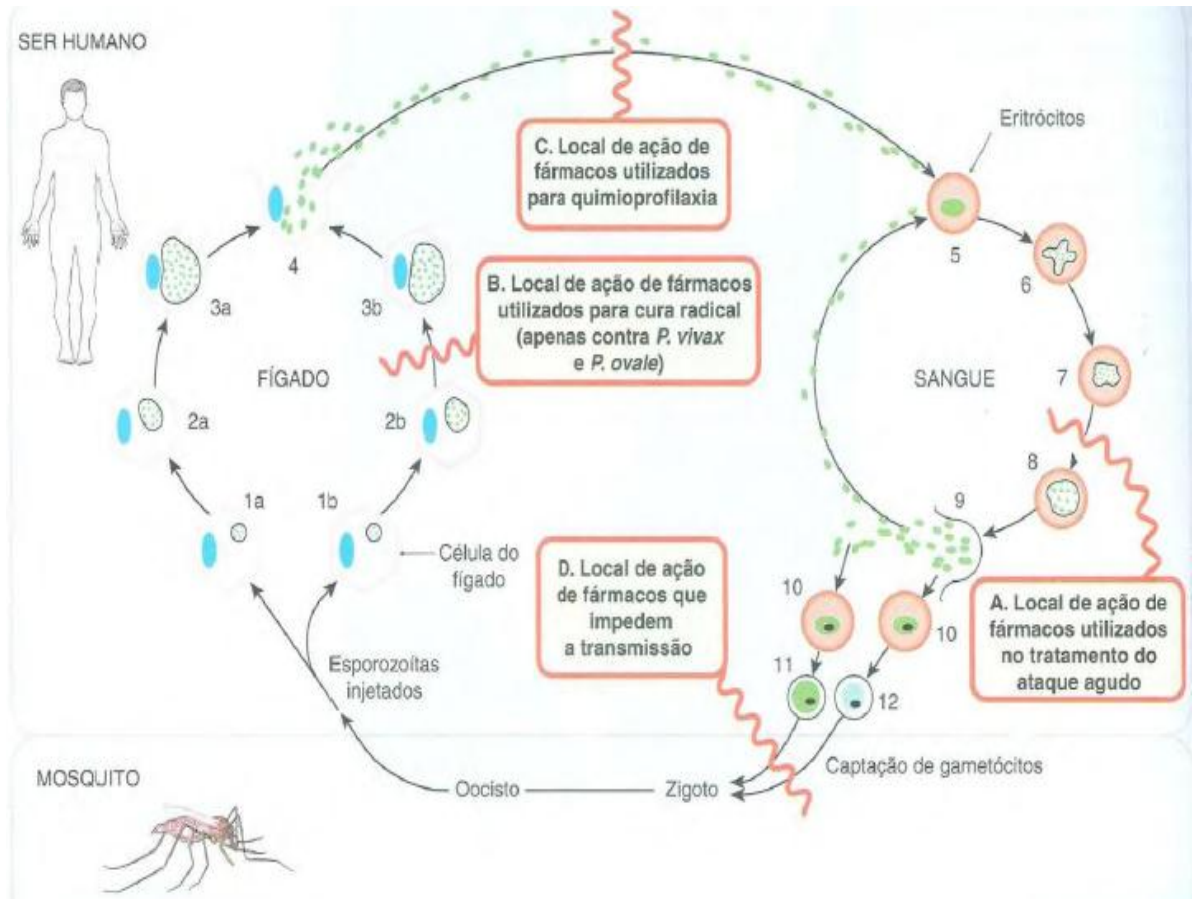


Figura 7- Ciclo de vida do parasita da malária e locais de ação dos fármacos. A. Fármacos utilizados no tratamento do ataque agudo, também chamado de agentes esquizotomicidas sanguíneos ou fármacos para cura clínica) B. Local de ação do fármaco que afetam os hipnozoítos exoeritrocitários e resulta em cura radical de *P. vivax* e *P. ovale*) C. Fármaco usados para o estágio exoeritrocitário e o estágio eritrocitário: utilizados para quimioprevenção. D. Fármacos que impedem a transmissão, ou seja, o aumento do reservatório humano da doença. Figura retirada de (Rang et al., 2004).

O tratamento quimioprolático (agentes profiláticos causais) tem a finalidade de bloquear o estágio exoeritrocitário e o estágio eritrocitário a fim de impedir os efeitos causados pela malária. A profilaxia causal, é a prevenção da infecção ocasionando a destruição dos esporozoítos após sua entrada nas células do sangue do hospedeiro. Já os agentes quimioproláticos são utilizados para matar os parasitas que passam para o fígado após o estágio pré-eritrocitário. As drogas utilizadas para este fim são cloroquina (Figura 1-b), pirimetamina (Figura 8-a), proguanil (Figura 8-b), mefloquina (Figura 1-c), ou uma combinação entre elas (Rang et al., 2004).

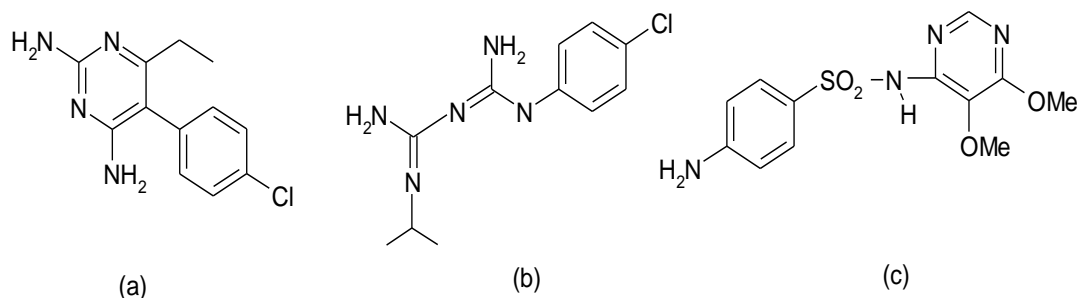


Figura 8- Estruturas dos antifolatos: pirimetamina (a) proguanil (b) sulfadoxina (c)

Existem algumas espécies do parasita *Anopheles* que se tornaram resistentes a algumas drogas, neste caso, *P.falciparum* e *P. vivax*, tornaram-se resistentes à cloroquina. Em alguns países, a resistência é considerada um problema crescente, sendo necessário o estudo de novos medicamentos mais eficazes. Por isso, existem as terapias de combinação baseadas em artemisininas, considerado um tratamento profilático de absorção rápida, o qual será abordado com mais detalhes a seguir.

3. RESISTÊNCIA AO USO DE FÁRMACOS NO TRATAMENTO DA MALÁRIA

O termo resistência está relacionado com a capacidade que uma espécie possui de se desenvolver e se multiplicar em seu processo biológico, independente da absorção e da quantidade de dose administrada de um determinado fármaco em cada paciente.

O surgimento de resistência da espécie *P. falciparum* por antimaláricos surgiu há décadas atrás, inicialmente pela cloroquina, e atualmente essa espécie apresenta resistência a diversos antimaláricos, como por exemplo, a mefloquina (Figura 2-c) e sulfadoxina (Figura 8-c) (Pimentel *et al.*, 2007). O *P. falciparum* se reproduz rapidamente nas células do sangue, e ao surgir os sintomas da malária, a doença se encontra num estágio de proliferação do parasita, ocasionando o caso de malária mais grave. Neste caso, o ciclo eritrocitário dura 48 horas nos seres humanos e produz malária terçã maligna, ou seja, reaparece de três em três dias indicando a forma mais letal de malária grave. Além disso, os eritrócitos parasitados fixam a eritrócitos não-infectados, formando agregados e interferindo no fluxo sanguíneo tecidual do hospedeiro. Conseqüentemente, provoca no organismo infectado, insuficiência renal e encefalopatia (malária cerebral) (Rang *et al.*, 2004). A maioria dos antimaláricos existentes não são eficazes no controle dessa espécie, apenas as classes de artemisininas possuem ação rápida em inibir o aumento desses parasitas na fase eritrocítica (Cunico *et al.*, 2008).

Outra ocorrência que propicia o surgimento de resistência está relacionada com o uso indiscriminado dos fármacos no tratamento da malária. Nesse sentido, a resistência é classificada como primária (quando o fármaco é utilizado pela primeira vez) ou adquirida (surge durante o tratamento com o fármaco). A resistência adquirida é consequência do aparecimento de alguns parasitas que são menos afetados ou que não são de modo algum afetados pelo fármaco, adquirindo maior vantagem em relação àqueles que são sensíveis ao fármaco. Além disso, a resistência pode originar de um aumento do efluxo (vazamento de uma determinada substância para fora da célula) do fármaco das vesículas do parasita. Vale salientar, principalmente a África, onde se utilizam extensivamente os antimaláricos. Devido ao aparecimento da resistência, diversos esforços na pesquisa de combinações de fármacos tem surgido na literatura. (Pimentel *et al.*, 2007; Rang *et al.*, 2004).

Um dos estudos para o desenvolvimento de novos fármacos no tratamento da malária foi baseado no sequenciamento do genoma do parasita. Sua ação no hospedeiro age principalmente na degradação da hemoglobina, na biossíntese de ácido fólico e na síntese de proteínas no apicoplasto (organela localizada em uma região adjacente ao complexo de Golgi) (Greenwood *et al.*, 2008; Souza *et al.*, 2010).

As pesquisas relacionadas à liberação dos esporozoítos nas células do sangue estão sendo realizadas em busca de um novo medicamento capaz de impedir a infecção das células do fígado por esses gametócitos. Dessa forma, existem laboratórios especializados em reproduzir as células hepatócitas em humanos infectados. Os testes clínicos realizados são *in vitro* e *in vivo* os quais se referem a procedimentos experimentais realizados em laboratório e em seres humanos, respectivamente. Em contrapartida, existem algumas adversidades que impedem esses pesquisadores de obterem resultados consistentes, dentre eles, a falta de investimentos básicos. Em nações africanas pesquisadores sofrem pela carência de infraestrutura, elevadas taxas de transmissão, necessidade de investimentos na prestação de cuidados com a saúde, principalmente no que se refere a aquisição de novos medicamentos. Por isso, ainda não foi apresentada nenhuma droga que inibe a proliferação destes esporozoítos, principalmente quando se trata das espécies *P. falciparum*, a forma mais letal da malária, e a *P. vivax*. É necessário que se investigue o ciclo biológico dessas espécies, a fim de obter uma droga que inative os parasitas nas células hepatócitas (Greenwood *et al.*, 2008).

Atualmente, o emprego da terapia de combinação baseadas em artemisininas ACTs (do inglês, *artemisinin-based combination therapy*) ou terapia de combinação baseada em artemisininas, tem sido utilizada no tratamento da malária, com a finalidade de aumentar a eficiência no tratamento. Assim, é necessário que os derivados de artemisinina tenham

rápida ação contra os parasitas, a fim de amenizarem os efeitos colaterais causados pelo uso desses medicamentos.

Na fronteira noroeste da Tailândia, por exemplo, estudos comprovaram que a ACT de mefloquina (Figura 1-c) e artemisinina (Figura 4-a) mostrou resultados satisfatórios para essa combinação, apesar dos parasitas terem desenvolvido resistência a mefloquina (Cunico *et al.*, 2008; Phyo *et al.*, 2012). Cabe ressaltar que a mefloquina possui um custo financeiro relativamente elevado o que impossibilita seu uso, e foi constatado problemas com relação a toxicidade (Greenwood *et al.*, 2008).

É necessário que os antimaláricos possuam duas propriedades que são relevantes. A primeira se refere à capacidade da substância eliminar os parasitas circulantes no sangue do hospedeiro e a segunda, está relacionada ao tempo em que o medicamento reduz a possibilidade de reinfeção no momento em que os parasitas se desintegram, levando a formação dos merozoítos (fase do fígado), e posteriormente a multiplicação deste último (Okell *et al.*, 2014).

O trabalho desenvolvido por Ghani e colaboradores avaliou a eficácia de duas ACTs: artemeter-lumefantrina (AL) (Figura 9-a) e diidroartemisinina-piperaquina (DHA-PQP) (Figura 9-b). Eles utilizaram um modelo matemático para simular a transmissão da malária na África e em regiões sazonais, com base em dados geográficos disponíveis. A DHA-PQP forneceu mais proteção contra a reinfeção e apresentou maior impacto em populações de risco. Já AL mostrou-se melhor ação contra a infecção. Foi possível prever uma redução de dois terços de incidência de malária em regiões africanas de risco, incluindo Gana, Senegal, Quênia e Nigéria com o uso de DHA-PQP (Okell *et al.*, 2014).

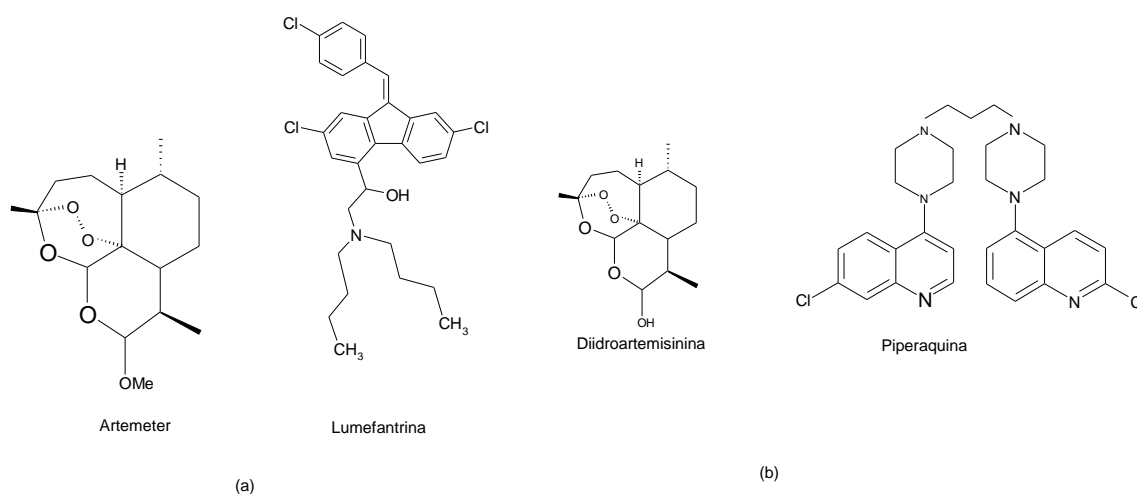


Figura 9 - Estrutura química das ACTs: (a) artemeter-lumefantrina (AL) e (b) diidroartemisinina-piperaquina (DHA-PQP)

É importante salientar que o tratamento da malária não se restringe apenas a eficácia dos medicamentos, mas também o acesso aos cuidados de saúde, aos custos do sistema de saúde e ao encargo financeiro substancial gerado, que às vezes pode ser reduzido usando o tratamento adequado para cada região (Okell *et al.*, 2014).

No Brasil o local de distribuição dos medicamentos antimaláricos estão disponíveis em todo território nacional por meio do SUS (Sistema Único de Saúde). Existe um Programa Nacional de Controle da Malária (PNCM) responsável por controlar todos os medicamentos e sua aplicabilidade na terapia da malária em indivíduos infectados (Portal da Saúde, 2014). O objetivo do PNCM é acabar com os casos de morte pela malária. Os registros de morte pela malária no Brasil são provenientes de regiões fora da Região Amazônica. Isso acontece devido à inexperiência de profissionais em lidar com casos de malária fora da região endêmica e ao diagnóstico tardio. Existem algumas áreas no Brasil que utilizam a cloroquina onde o tratamento com essa substância é eficaz. No caso de malária grave se utiliza artesunato injetável, seguido de ACTs. Em 2011, os estados do Pará, Amazonas, Rondônia, Acre, Amapá e Roraima, tiveram mais evidências de casos. A Fiocruz produz artesunato + mefloquina e também conta com diversos laboratórios de pesquisa localizados em Minas Gerais, Rio de Janeiro, Rondônia (Agência Fiocruz, 2013).

Com a descoberta da eficácia da artemisinina (Figura 4-a) e seus derivados na terapia de tratamento da malária, se faz necessário relatar alguns mecanismos de ação dessa substância. Porém, foi constatado que seu mecanismo é considerado ainda incompleto e complexo, por isso serão abordados, a seguir, os dados disponíveis na literatura.

4. MECANISMO DE AÇÃO DA ARTEMISININA

O ciclo biológico do *P. falciparum*, a espécie mais nociva ao homem, se inicia nas células eritrocíticas (células vermelhas do sangue). A hemoglobina do hospedeiro é transportada para o vacúolo digestório do parasita, onde é digerida por proteases (plasmepsina, falcipainas, entre outras) em aminoácidos livres. Em seguida, o grupo heme é polimerizado a cristais de hemozoína. (O'Neill & Porner, 2003).

A seguir será mostrado que a ponte endoperóxido da artemisinina é ativada pelo íon ferroso Fe^{2+} e por isso, nessa fase eritrocítica, a artemisinina e seus derivados são considerados tóxicos para o parasita da malária em concentrações nanomolares. Vale salientar que a artemisinina proporciona um aumento nas concentrações de hemoglobina no sangue do hospedeiro. Por isso, devido ao processo de degradação da hemoglobina,

diversos pacientes já foram diagnosticados com anemia grave, além dos demais sintomas que a malária pode acometer ao paciente (dores de cabeça, febres intermitentes e calafrios) (Miller *et al.*, 2013; O'Neill & Porner, 2003; Yarnell, 2014).

4.1 – Interação entre o grupo heme e a Artemisinina

A hemoglobina é a proteína transportadora de oxigênio molecular (O_2) encontrada nos eritrócitos, e de forma simplificada, pode ser considerada como um tetrâmero em que cada unidade apresenta um grupo porfirínico contendo um íon ferroso central, também conhecido como heme (Figura 10). O heme consiste em um sistema de quatro anéis tetrapirrol (protoporfirina IX) complexados com ferro (Horton *et al.*, 2013). A ligação com o ferro ocorre em seu estado de oxidação Fe^{2+} (ferroso), sendo formado um complexo com seis ligantes, quatro dos quais são átomos de nitrogênio da protoporfirina IX (Eckstein-Ludwig *et al.*, 2003; Horton *et al.*, 2013). O mecanismo de transporte de oxigênio molecular ocorre por meio da ligação entre O_2 e o íon ferroso (Fe^{2+}) do heme.

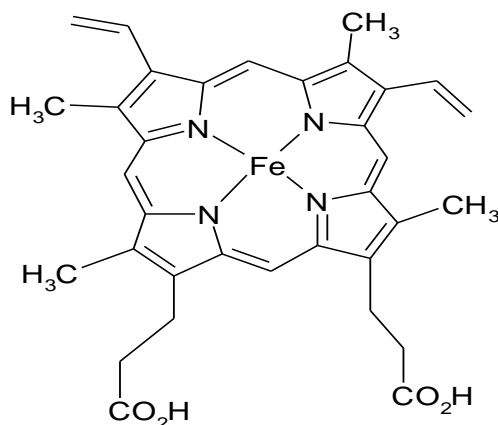


Figura 10 - Estrutura da ferriprotoporfirina IX (grupo heme)

Dentro do eritrócito, a hemoglobina do hospedeiro é transportada para o interior do parasita em um compartimento ácido, conhecido como vacúolo digestório. A hemoglobina é então quebrada por enzimas proteolíticas a peptídeos que são subsequentemente degradados a aminoácidos, essenciais ao seu desenvolvimento. Nesse processo, o grupo heme é liberado e oxidado à hematina [Fe(III)-protoporfirina IX], caracterizada por ser uma substância tóxica e acumulada no interior do parasita. Por essa razão, o parasita desenvolveu um mecanismo para formação de hemozoína (pigmento malárico), uma substância isenta de toxicidade, conforme mostrado da Figura 11 (O'Neill *et al.*, 2010).

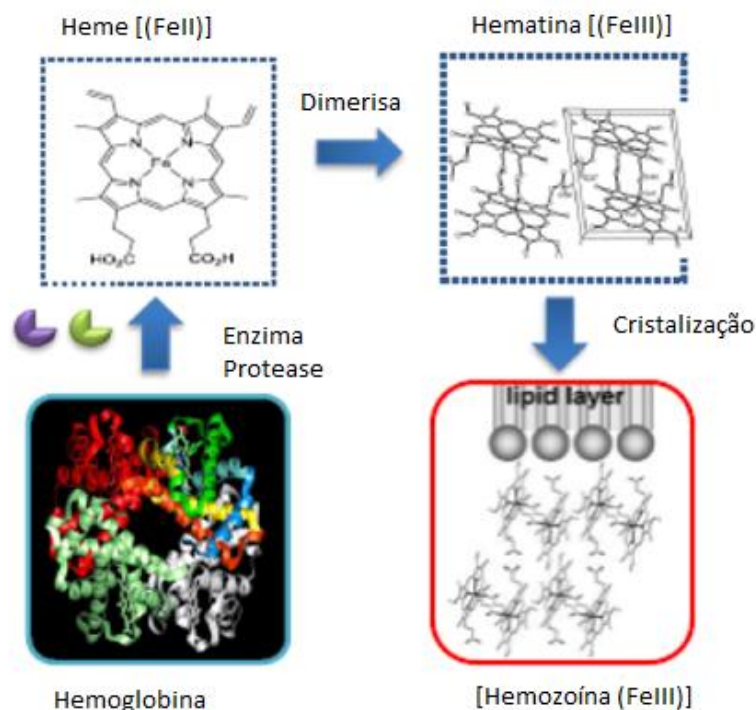


Figura 11 - Formação do heme por meio da hemoglobina ativada pela enzima protease levando a oxidação do íon ferroso em hematina (Fe^{3+}) tóxica e hemozoína não-tóxica. Figura adaptada de (O'Neill et al., 2010)

O processo de desintoxicação do parasita conforme mostrado na Figura 11, se inicia com a formação do heme a partir da hemoglobina, que em seguida se converte em hematina, por meio de ligações ferro-carboxilato de uma das cadeias laterais dos monômeros do heme (O'Neill et al., 2010). Posteriormente, a hematina tóxica necessita ser cristalizada em hemozoína não tóxica para o parasita, processo denominado de biomineralização (Ding et al., 2011; O'Neill et al., 2010). Diversas pesquisas sugerem que a ligação endoperóxido na artemisinina é clivada pelo íon Fe^{2+} liberando radicais livres de artemisinina, impedindo a desintoxicação do heme no interior do parasita (Ding et al., 2011).

Vale salientar que o mecanismo de ação da artemisinina com o heme ainda não está completamente estabelecido, e não se sabe ao certo se o heme é ativado ou é um alvo molecular de ação para a artemisinina (Ding et al., 2011).

4.2 – Formação de radicais centrados em carbono e em oxigênio

Um dos mecanismos baseados na formação dos radicais centrados em carbono e em oxigênio é denominado de modelo de cisão redutiva. O processo ocorre por meio da

clivagem homolítica (quebra de ligação, na qual cada fragmento retira um dos elétrons da ligação, formando espécies com elétrons desemparelhados chamados de radicais) da ponte endoperóxido, ocasionada pelo íon Fe^{2+} , levando à formação de um radical centrado em oxigênio. Este composto sofrerá um rearranjo, formando um radical centrado em carbono primário ou secundário (Fryhle; O'Neill *et al.*, 2010; Solomons, 2009, p.408). Essa distinção de radical primário ou secundário se deve ao fato da ligação endoperóxido ser assimétrica, proporcionando ao íon Fe^{2+} diferentes formas de interação com a ponte endoperóxido. Estes radicais podem reagir com biomoléculas que são essenciais para a sobrevivência do parasita. Porém, se não houver a combinação desses radicais com as biomoléculas, provavelmente ocorrerá a formação de moléculas neutras, a partir de rearranjos. Esse mecanismo está ilustrado na Figura 12 (O'Neill *et al.*, 2010).

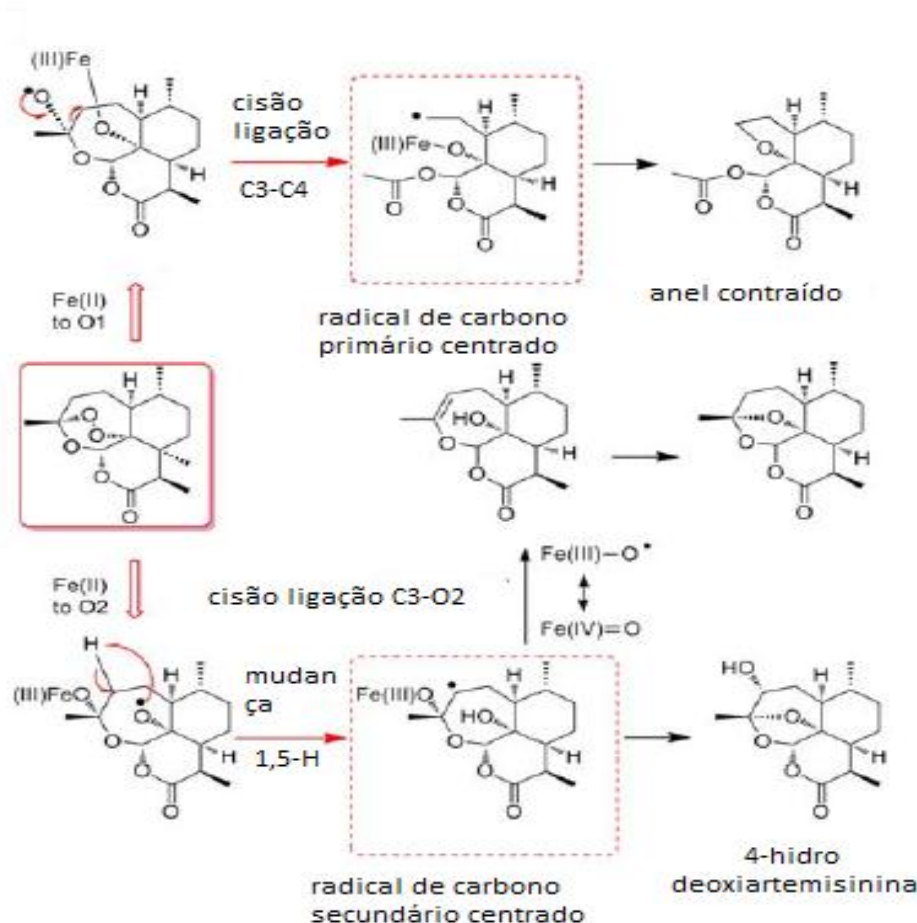


Figura 12 - Mecanismo do modelo de cisão redutiva. Figura adaptada de (O'Neill *et al.*, 2010)

Conforme mencionado anteriormente, os radicais formados no modelo de cisão redutiva são altamente reativos e dessa forma, podem não reagir com as proteínas do parasita ou os alvos moleculares. Por isso, foi proposto outro modelo denominado peróxido

aberto. Ele consiste por uma clivagem heterolítica (quebra de uma ligação na qual forma-se um fragmento com ambos elétrons da ligação, o outro fragmento com orbital vazio, chamada de reação iônica), na presença de um ácido de Lewis (Fryhle; Solomons, 2009, p. 216, 217).

A definição de ácido de Lewis se refere à espécie que recebe um par de elétrons, e uma base de Lewis, é toda espécie que doa um par de elétrons. Assim, a ponte endoperóxido da artemisinina se comporta como uma base de Lewis. O motivo que leva a um ácido de Lewis receber um par de elétrons, justifica a presença de um orbital vazio de menor energia, ou uma ligação polar com o hidrogênio de forma que este doe o H^+ (possui um orbital vazio). Os ácidos de Lewis inclui diversas espécies além do íon H^+ , tais como, cátions metálicos como o Fe^{2+} , Mg^{2+} , são considerados ácidos de Lewis, pois recebem um par de elétrons ao formarem uma ligação com uma base (McMurry, 2011, p. 53-54).

Logo, a presença de um ácido de Lewis produz a formação de um carbocátion terciário, considerado estável, para que ocorra o ataque de uma molécula de água nesse carbono, permitindo a abertura do anel. A ordem de estabilidade dos carbocátions aumenta à medida que ocorre o aumento de substituição, sendo:

terciário > secundário > primário > metila

Um dos fatores que envolve a estabilidade dos carbocátions deve-se aos efeitos indutivos. Os efeitos indutivos originam do deslocamento de elétrons em uma ligação σ , devido à eletronegatividade de um átomo vizinho, no caso da molécula de artemisinina, o oxigênio. Portanto, quanto maior o número de substituintes no átomo de carbono positivo, mais deslocada será a densidade eletrônica em direção à carga, intensificando uma maior estabilização indutiva do cátion (McMurry, 2011).

Após a abertura do anel endoperóxido, ocorre a formação de um hidroperóxido insaturado necessário para oxidar resíduos de proteínas existentes no interior do parasita, e a formação de um radical hidroxila, por meio de redução de Fenton. O mecanismo do modelo de peróxido aberto está esquematizado na Figura 13 (O'Neill *et al.*, 2010).

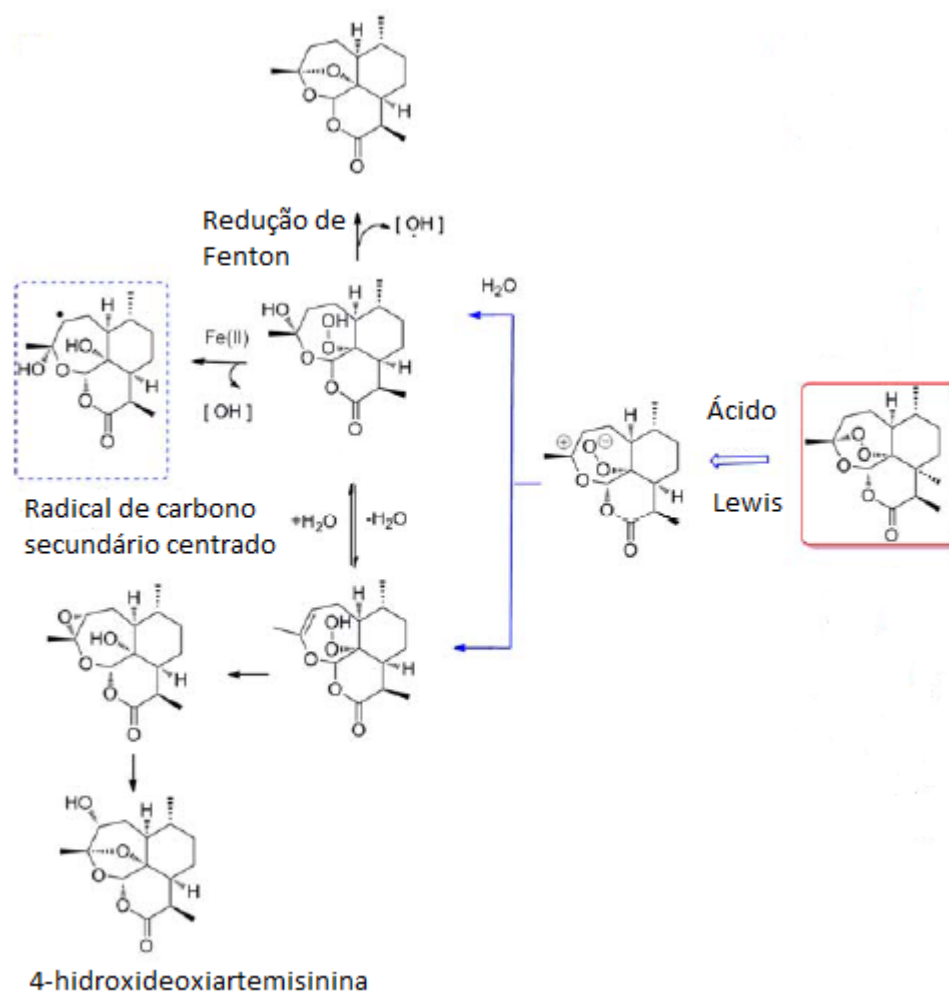


Figura 13 - Mecanismo de reação para o modelo de abertura do anel endoperóxido de artemisinina. Figura adaptada de (O'Neill et al., 2010)

A redução de Fenton consiste na reação entre o grupamento peróxido e o Fe^{2+} (íon ferroso) que atua como agente redutor da reação, promovendo sua oxidação à Fe^{3+} (íon férrico), formando também uma hidroxila e um radical $\cdot\text{OH}$, conforme mostrado na equação a seguir.



Essa reação se baseia na ação catalítica do íon ferroso, havendo a dissociação dos peróxidos. Esse mecanismo leva à oxidação de aminoácidos presentes no interior do parasita, ocasionando sua morte (McMurry, 2011, p. 53-54).

Com a posterior degradação da hemoglobina no vacúolo digestório do parasita ocorre a liberação de aminoácidos que são essenciais à sua sobrevivência. Dentre os mais estudados vale mencionar as proteases, como plasmepsinas, falcipainas e falcilisinases, as proteína-quinases e enzimas glicolíticas, as quais estão envolvidas em metabolismo lipídico e replicação de DNA. Incluindo a PfATP6, uma enzima ATPase cálcio dependente, que vem sendo largamente estudada. Constitui-se em principais alvos moleculares da artemisinina.

4.3– Receptor PfATP6

Dentre as moléculas propostas como alvo molecular, pode-se citar a enzima transportadora de íons cálcio dependente de ATP localizada no retículo endoplasmático do parasita, denominada de SERCA (Sarcoendoplasmático Ca^{2+} ATPase) e identificada por PfATPase6, presente no cromossomo 1 da espécie *Plasmodium falciparum* e constituída por 1228 aminoácidos (Eckstein-Ludwig *et al.*, 2003). (Udaykumar, 2014). Por ser considerado um mensageiro intracelular, o Ca^{2+} é responsável por controlar diversas funções celulares, tais como, metabolismo da glicose, crescimento celular, contração muscular, entre outras (Horton *et al.*, 2013).

Nesse sentido, entender as características no sequenciamento do genoma de espécies *Plasmodium* e investigar as proteínas existentes pode proporcionar a descoberta de novos compostos farmacológicos (Leite *et al.*, 2013; Shandilya *et al.*, 2013). Os alvos moleculares mais estudados são as proteases, proteína quinase, enzimas glicolíticas, bem como enzimas que estão envolvidas no metabolismo de lipídeos e a replicação do DNA (Sahu *et al.*, 2008).

Baseados na pesquisa de Lee e colaboradores foi mostrado que a artemisinina pode ser um antimalárico importante de inibição da SERCA. Sua atividade de inibição foi comprovada em ovos de *Xenopus laevis* (espécie de rã africana) e assim os autores puderam concluir que a artemisinina atua semelhantemente à taspigargina (Figura 14), uma lactona sesquiterpênica inibidora específica do SERCA (Eckstein-Ludwig *et al.*, 2003).

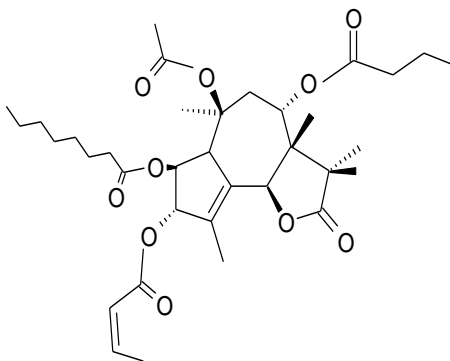


Figura 14- Estrutura química da taspigargina

A taspigargina é uma lactona sesquiterpênica que aumenta as concentrações citosólicas de cálcio no retículo sarcoplasmático inibindo a SERCA de mamíferos e espécies *Plasmodium*, e portanto, bloqueia o transporte de cálcio para a membrana plasmática (Leite *et al.*, 2013). A artemisinina interage com o sítio de PfATP6, da mesma maneira que a taspigargina (Figura 14) (Leite *et al.*, 2013).

Estudos recentes realizados por Naik e colaboradores identificaram o mecanismo de ação da artemisinina e seus análogos na proteína PfATP6 por meio de estudos docking (encaixe da artemisinina à proteína) envolvendo mecânica molecular. Os parâmetros de análise envolvidos foram, análises energéticas (energia livre de Gibbs), e principalmente a contribuição da interação hidrofóbica (associação de uma molécula ou de um grupo não polar com outras moléculas não polares, as moléculas polares de água que as circundam tendem a se dissociar umas com as outras) da artemisinina e de seus derivados. A estrutura tridimensional da maioria das proteínas é determinada pelas interações hidrofóbicas formadas durante o enovelamento espontâneo da cadeia polipeptídica. As moléculas de água se ligam à superfície da proteína, porém não conseguem penetrar em seu interior, onde está localizado a maioria dos grupos apolares (Horton *et al.*, 2013). Logo, os 150 análogos de artemisinina mostraram uma interação hidrofóbica com a proteína PfATP6. Portanto, a artemisinina é considerada uma substância inibidora da proteína PfATP6 (Naik *et al.*, 2011).

Embora existam estudos que sugerem a inibição da artemisinina sobre essa proteína, Arnou e colaboradores utilizaram a proteína purificada, mostrando que a artemisinina não demonstrou nenhuma inibição na PfATP6 isolada, e sua estrutura conformacional permaneceu inalterada após adição da droga, mesmo em concentrações elevadas (500 μM). Adicionalmente, destacaram também que, PfATP6 pode atuar de maneira indireta no mecanismo de ação da artemisinina em *P. falciparum* (Arnou *et al.*, 2011).

O modo de ação da artemisinina e seus derivados ainda não foi estabelecido, porém existem suposições. Uma série de genes do parasita tem sido sugerido pra verificar a inibição da artemisinina aos mesmos, e no entanto, nenhum foi validado. A espécie PfATP6 possui diversos polimorfismos de nucleotídeos (compostos por um açúcar do grupo das pentoses, monossacarídeo com cinco átomos de carbono – ribose ou desoxirribose, um radical fosfato, H_3PO_4 e uma base orgânica nitrogenada – adenina, citosina, guanina, timina, uracila) um deles é codificado por S769N. Tem sido constatado que este marcador bioquímico, passou a adquirir redução à sensibilidade por derivados de artemisinina na Guiana Francesa. Em um estudo realizado recentemente, Parker e colaboradores utilizaram uma estratégia de troca de alelos afim de projetar parasitas que transportam a mutação S769N em espécies *P. falciparum*. Foram comparadas a sensibilidade dessa espécie com três análogos de artemisinina, artemeter, diidroartemisinina e artesunato em dezoito experimentos biológicos. Logo, puderam concluir que a expressão gênica dessa espécie não possui associação com resistência à artemisinina (Cui *et al.*, 2012; Horton *et al.*, 2013).

4.4 – Enzima cisteíno-proteases

No vacúolo digestório do parasita ocorre a degradação da hemoglobina e conseqüentemente, a liberação de aminoácidos essenciais para sua sobrevivência e para a síntese de proteínas (O'Neill *et al.*, 2003). As cisteíno-proteases são de grande interesse para a descoberta de medicamentos antimaláricos. A espécie *P. falciparum* expressa quatro cisteíno-proteases da família papaína falcipainas, dentre elas, falcipaina 2 e falcipaina 3, as quais são os alvos moleculares mais estudados (Capela *et al.*, 2009).

As proteases são enzimas que catalisam a hidrólise das ligações peptídicas, liberando fragmentos denominados de peptídeos. Após esse processo, a proteína perde sua conformação estrutural. Dessa forma, as proteases são agrupadas de acordo com o sítio catalítico ativo, neste caso, cisteína. Elas podem ser classificadas em exopeptidases (quebram uma ligação peptídica a partir de uma extremidade com carbono ou nitrogênio terminal) ou endopeptidases (quebram uma ligação peptídica interna) (Francisco Jr. & Francisco, 2006).

Conforme mencionado, as falcipainas são objeto de estudo para o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos e dessa maneira, a falcipaina 2 está envolvida na degradação de proteínas da hemoglobina e de membranas ligadas ao eritrócito (células do sangue). Os inibidores da falcipaina possuem a função de evitar a hidrólise da hemoglobina no interior do parasita, impedindo a degradação dos eritrócitos (Chakka *et al.*, 2015).

Nesse sentido, o trabalho realizado por Pandey e colaboradores mostrou que as atividades de cisteíno-proteases são inibidas por artemisinina no interior do vacúolo digestório da espécie *Plasmodium yoelli* (Pandey *et al.*, 1998).

Em outra pesquisa realizada por Capela e colaboradores foi mencionado que o parasita pode adquirir resistência ao uso de inibidores de protease, tornando algo preocupante para a terapia da malária. Por esse motivo, eles buscaram desenvolver uma síntese de substâncias com potencial para retardar o surgimento de resistência pelas proteases, por meio de uma série de moléculas híbridas de artemisinina-vinil sulfona com potencial. Essas substâncias possuem a função de atuar no vacúolo digestório da espécie, por meio da ativação do endoperóxido e inibição da falcipaina 2. Contudo, essas moléculas mostraram exibir potente atividade contra a espécie *Plasmodium falciparum* e, por isso, eles pretendem sintetizar outros núcleos de artemisinina para essa finalidade (Capela *et al.*, 2009).

Contudo, diante das subjeções propostas pelos pesquisadores à respeito do mecanismo de inibição da artemisinina fica claro que seu mecanismo é complexo e ainda não está estabelecido, sendo necessário mais pesquisas a fim de esclarecer algumas contradições que foram apresentadas.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A malária é uma doença endêmica, responsável por milhares casos de morte em regiões onde os recursos de saúde são escassos. Além da África, os países com maior diagnóstico da doença são Afeganistão, Bangladesh, Brasil, Camboja, China, Irã, Índia, entre outros. Conforme informado pela Organização Mundial da Saúde a malária mata mais do que a AIDS, e os principais sintomas são febres, seguidas de calafrios, dores articulares, convulsões generalizadas, podendo acarretar até em coma. Há 2700 a. C. já se tinham evidências dos sintomas provenientes da malária. Durante esse período, diversas pessoas que marcaram a história mundial vieram a óbito devido à malária e à falta de informações sobre a doença. Diante dos casos de morte, pesquisadores como Louis Pasteur e Robert Koch, pioneiro em estudos microbiológicos, iniciaram suas pesquisas a partir da criação de instrumentos ópticos para realizar testes clínicos em laboratório.

Ao longo dos últimos 100 anos, diversas substâncias para terapia da malária foram sendo descobertas. Entre elas a mais eficaz, artemisinina, responsável no combate à espécie mais maléfica, *Plasmodium falciparum*. Youyoy Tu, pesquisadora chinesa, responsável por extrair a substância ativa da planta *Artemisia annua*, foi um dos laureados

pelo Prêmio Nobel de Medicina de 2015. A sua descoberta propiciou uma redução de cerca de 100 mil casos de mortes por ano, e trouxe mais esperança de vida para diversas pessoas de áreas pobres do mundo.

Devido ao surgimento de resistência por algumas drogas, a artemisinina é usada como terapias de combinação baseadas em artemisininas (ACTs), o que garante maior eficácia no tratamento da malária e evita o desenvolvimento de resistência ao parasita.

No entanto o mecanismo de ação da artemisinina é complexo e ainda não foi estabelecido e dessa forma existem propostas, principalmente referente ao mecanismo de inibição das enzimas proteolíticas. Adicionalmente, há algumas dúvidas com relação a ativação da artemisinina. Se ela é ativada pelo íon ferroso (Fe^{2+}) do grupo heme ou se este é um alvo molecular de ação para a artemisinina. De fato, existem diversas pesquisas a respeito do mecanismo de ação das artemisininas. Porém, o que ainda não está claro é com relação à inibição das artemisininas às enzimas proteolíticas no vacúolo digestório do parasita. Os artigos e livros disponíveis abordam as enzimas proteolíticas como uma suposição de alvo molecular para a artemisinina, porém com algumas contradições. Dessa forma, percebe-se que ainda são necessários mais estudos a respeito do mecanismo de ação da artemisinina sobre essas enzimas proteolíticas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

Arnou, B.; Montigny, C.; Jaxel, C.; Morth, J. P.; Moller, J. V.; Maire, M.; Nissen, P. The *Plasmodium falciparum* Ca^{2+} -ATPase PfATP6: insensitive to artemisinin, but a potential drug target. *Biochemical Society Transactions*. **2011**, 823, 824, 828-830.

Ba, Q.; Wang, H.; Tian, J. q.; Li, J. q.; Duan, J.; Xiang, L.; Chen, P. z.; Chu, R.a.; Wu, S. j.; Chen, T.; Li, X. g.; Wang, Z. I. Dihydroartemisinin promotes angiogenesis during the early embryonic development of zebrafish. *Acta Pharmacologica Sinica*. **2013**, 1101, 1102.

Barreiro, E. J.; Bolzani, V. S. Biodiversidade: Fonte potencial para descoberta de novos fármacos. *Química Nova*. **2009**, 680.

Biamonte, M. A; Wanner, J.; Le Roch, K. G.; Recent advances in malaria drug discovery. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. **2013**. 2829-2840.

Camargo, E. P. Malária, Maleita, Paludismo. *Endemias*. **2003**, 26-27.

Capanna, E. Grassi versus Ross: who solved the riddle of malaria?. *International Microbiology*. **2006**, 69-74.

Capela, R.; Domingos, A.; Lopes, F.; Gut, J.; Gonçalves, L. M.; Rosenthal, P. J.; Oliveira, R.; Moreira, R. Artemisinin-dipeptidyl vinyl sulfone hybrid molecules: Design, synthesis and preliminar SAR for antiplasmodial activity and falcipain-2-inhibition. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. **2009**, 3229-3232.

Chakka, S. K.; Mohmmed, A.; Kotra, L. P.; Wei, L.; Kalamuddin, M.; Malhotra, P.; Mahesh, R.; Mundra, S.; Sundararaman, S. Identification of novel class of falcipain-2 inhibitors as potential antimalarial agentes. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **2015**, 2221, 2222.

Cunico, W; Gomes, C. R. B.; Marques, G. H.; Carvalho, S. A.; Fármacos antimalariais – história e perspectivas. *Revista Brasileira de Farmacologia*. **2008**. 52-54.

Cui, L.; Parker, D.; Wang, H.; Jiang, H.; Cui, L.; Su, X-Z.; Wang, Z. Lack of Association of the S769N Mutation in *Plasmodium falciparum* SERCA (PfATP6) with Resistance to Artemisinins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **2012**, 2549, 2550.

Ding, X. C.; Raso, G.; Beck, H. P. *Plasmodium* sensitivity to artemisinins: magic bullets hit elusive targets. *Trends in Parasitology*. **2011**, 73-75.

Eckstein-Ludwig, U; Lee, A. G.; van Goethem, I. D. A.; East, J. M.; Bray, P. G.; O'Neill, P. M., Webb, R. J.; Krishna, S.; Ward, S. A.;. Artemisinins target the SERCA of *Plasmodium falciparum*. *Nature*. **2003**, 957-961.

Fraga, C. A. M.; Barreiro, E. J. *Química Medicinal: As bases moleculares da ação dos fármacos*, 2ª ed.; *Artemed*: Porto Alegre, **2008**.

França, T. C. C.; Santos, M. G.; Villar-Figueiroa, J. D. Malária: Aspectos Históricos e Quimioterapia. *Química Nova*. **2008**, 1271-1275.

Francisco Jr., W. E.; Francisco, W. Proteínas: Hidrólise, Precipitação, e um tema para o ensino de Química. *Química Nova na Escola*. **2006**, 15.

Fryhle, C. B.; Solomons, T. W. G.; *Química Orgânica*, 9ª ed.; Livros Técnicos e Científicos: Rio de Janeiro, RJ, 2009.

Greenwood, B. M.; Fidock, D. A.; Kyle, D. E.; Collins, F. H.; Duffy, P. E.; Alonso, P. L. Malaria: progress, perils, and prospects for eradication. *The Journal of Clinical Investigation*. **2008**, 1266-1273.

Haynes, R. K.; Krishna, S. Artemisinins: activities and actions. *Microbes and Infection*. **2004**, 1341.

Horton, H. R.; Scrimgerour, K. G.; Moram, L. A.; Perry, M. D. *Bioquímica*, 5ª ed.; Pearson: São Paulo, **2013**.

La-Scalea, M. A, Ferreira, E. I.; Silva, H. S. R. C.; Redução voltamétrica de artemisinina e sua interação com grupo heme(hemina). *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. **2007**, 372, 373.

Leite, F. H. A.; Taranto, A. G; Fonseca, A. L.; Varotti, F. P.; Nunes, R. R.; Júnior, M. C. Malária: Dos velhos fármacos aos novos alvos moleculares. *Biochemistry and Biotechnology Reports*. **2013**, 60, 66-69.

Liao, F. Discovery of Artemisinin (Qinghaosu). *Molecules*. **2009**, 5362, 5363.

McMurry, J.; *Química Orgânica*, 7ª ed.; Cengage Learning: São Paulo, SP, 2011.

Menegatti, R.; Fraga, C. A. M.; Barreiro, E. J. A importância da Síntese de Fármacos. *Química Nova na Escola*. **2001**. 19

Molyneux, D. H.; Ward, S. A. Reflections on the Nobel Prize for Medicine 2015 – The Public Health Legacy and Impact of Avermectin and Artemisinin. *Trends in Parasitology*. **2015**, 3.

Miller, L. H.; Ackerman, H. C.; Wellems, T. E.; Su, X. z. Malaria biology and disease pathogenesis: insights for new treatments. *Nature Medicine*. **2013**, 156-164.

Miller, L.; Su, X. Artemisinin: Discovery from the Chinese Herbal Garden. *Elsevier Inc*. **2011**, 855 - 858.

Naik, P. K.; Dubey, A.; Singh, H.; Srivastava, M.; Bajaj, P.; Ranjan, P.; Kumar, R.; Jain, S. The binding modes and binding affinities of artemisinins derivatives with *Plasmodium falciparum* Ca²⁺-ATPase (PfATP6). *Journal of Molecular Modeling*. **2011**, 333, 334, 343, 347.

Okell, L. C.; Ghan, A. C.; Ubben, D.; Jagoe, G.; Griffin, J. T.; Tarning, J.; Baker, M.; Cairns, M.; Ferguson, N. M.; Hugo, P.; Bousema, T.; D' Alessandro, U. Contrasting benefits of different artemisinin combination therapies as first-line malaria treatments using model-based cost-effectiveness analysis. *Nature Communications*. **2014**, 1-9.

Olowe, O. A.; Awa, A. O.; Makanjua, O. B.; Olowe, R.A. Malaria in Africa and the Historical Perspective: The Journey so Far. *Journal of Biology and Medical Sciences*. **2015**, 33, 34.

O'Neill, P. M.; Porner, G. H. A Medicinal Chemistry Perspective on Artemisinin and Related Endoperoxides. *Journal of Medicinal Chemistry*. **2004**, 2945-2964.

O'Neill, P. M.; Ward, S. A.; Barton, V. E. The molecular mechanism of Artemisinin: The debate continues. *Molecules*. **2010**, 1707-1710.

Owens, B. 2015 Nobel Prize goes to antiparasitic drug discoverers. *World Report*. **2015**, 1433.

Pandey, A. V.; Tekwani, B. L.; Singh, R. L.; Chauhan, V. S. Artemisinin, an Endoperoxide Antimalarial, Disrupts the Hemoglobin Catabolism and Heme Detoxification Systems in Malarial Parasite. *The Journal of Biological Chemistry*. **1998**, 19383.

Phyo, A. P.; Dondorp, A. M.; Moo, C.; Ashley, E. A.; Nosten, F.; Stepniewska, K.; MaungLwin, K.; White, N. J.; Day, N. P. J.; Singhasivanon, P.; McGready, R.; Al-Saai, S.; Nair, S.; Nkhoma, S.; Anderson, T. J. C. Emergence of artemisinin-resistant malaria on the western border of Thailand: a longitudinal study. *The Lancet*. **2012**, 1960-1966.

Pimentel, L. F.; Júnior, A. T. J.; Santos-Magalhães, N. S.; Mosqueira, V. C. F. Nanotecnologia farmacêutica aplicada ao tratamento da malária. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. **2007**, 505.

Rang, H. P.; Ritter, J. M.; Dale, M.M.; Moore, P. K. *Farmacologia*. 5^a ed.; Elsevier, **2004**.

Sahu, N. K.; Kohli, D. V.; Sahu, S. Novel Molecular Targets for Antimalarial Drug Development. *Chemical Biology & Drug Design*. **2008**, 287.

Shandilya, A.; Jayaram, B.; Ghosh, I.; Chacko, S. A plausible mechanism for the antimalarial activity of artemisinin: A computational approach. *Scientific Reports*. **2013**, 1, 2.

Souza, W; Martins-Duarte, E. S.; Lemgruber, L.; Attias, M.; Vommaro, R. C. Organização estrutural do taquizoíta de *Taxoplasma gondii*. *Scientia Medica*. **2010**, 137.

Teixeira, C.; Gomes, A.; Pérez, B.; Gomes, J. R. B.; Vale, N.; Gomes, P. “Recycling” Clássica Drogas for Malária. *Chemical Reviews*. **2014**, 11165-11172

Udaykumar P. Discovery of artemisinin: The Chinese wonder drug. *Muller Journal of Medical Science and Research*. **2014**, 191,192.

Yarnell, E. Artemisia annua (Sweet Annie), other Artemisia species, Artemisinin, Artemisinin derivatives, and Malaria. *Journal Compilation*. **2014**, 70-73.

<<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/662-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/malaria/11347-tratamento>> Acesso em: 15 de Novembro de 2015.

< <http://www.agencia.fiocruz.br/malaria> > Acesso em: 15 de Novembro de 2015.