

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE *in vitro* DE
ISOLADOS DE CAMPO DE *Plasmodium falciparum* E
Plasmodium vivax A SUBSTÂNCIAS E EXTRATOS DE
PLANTAS AMAZÔNICAS

JAQUELINE SIQUEIRA DA COSTA

MANAUS

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

JAQUELINE SIQUEIRA DA COSTA

AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE *in vitro* DE
ISOLADOS DE CAMPO DE *Plasmodium falciparum* E
Plasmodium vivax A SUBSTÂNCIAS E EXTRATOS DE
PLANTAS AMAZÔNICAS

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas da
Universidade Federal do
Amazonas, como requisito para a
obtenção do título de Mestre em
Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Dr. Adrian Martin Pohlit

Coorientador: Dr. Luiz Francisco Rocha e Silva

MANAUS

2016

JAQUELINE SIQUEIRA DA COSTA

**AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE *in vitro* DE
ISOLADOS DE CAMPO DE *Plasmodium falciparum* E
Plasmodium vivax A SUBSTÂNCIAS E EXTRATOS DE
PLANTAS AMAZÔNICAS**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas da
Universidade Federal do
Amazonas, como requisito para a
obtenção do título de Mestre em
Ciências Farmacêuticas.

BANCA EXAMINADORA

Presidente: Dr. Adrian Martin Pohlit

Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA

Avaliador: Dr. João Vicente Braga de Souza

Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA

Avaliadora: Dra. Gisely Cardoso de Melo

Universidade do Estado do Amazonas-UEA

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

C837a Costa, Jaqueline Siqueira da
Avaliação da susceptibilidade in vitro de isolados de campo de Plasmodium falciparum e Plasmodium vivax a substâncias e extratos de plantas amazônicas / Jaqueline Siqueira da Costa. 2016
106 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Adrian Martin Pohlit
Coorientador: Luiz Francisco Rocha e Silva
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) -
Universidade Federal do Amazonas.

1. malária. 2. produtos naturais. 3. P. falciparum. 4. P.vivax. 5. novas drogas. I. Pohlit, Adrian Martin II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

"Ora, àquele que é poderoso para fazer infinitamente mais do que tudo quanto pedimos ou pensamos, conforme o seu poder que opera em nós, a ele seja a glória, na igreja e em Cristo Jesus, por todas as gerações, para todo o sempre. Amém!"

(Efésios 3:20-21)

AGRADECIMENTOS

A Deus por ser minha torre forte e socorro bem presente.

Ao meu orientador Dr. Adrian Martin Pohlit pela oportunidade do ensino e aprendizado, ao conhecimento passado, a orientação prestada sempre que necessária.

Ao meu coorientador Dr. Luiz Francisco Rocha e Silva por sua dedicação, compreensão, paciência, orientação prestadas na elaboração deste trabalho, além da amizade demonstrada ao longo destes anos, muito obrigada!

À Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado pela oportunidade de desenvolver projetos de pesquisa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) e ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) pela concessão da bolsa, estrutura para desenvolvimento do presente trabalho.

À Universidade Federal do Amazonas (UFAM) e ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) pela oportunidade e por todo suporte.

Aos examinadores deste trabalho: Dr. João Vicente Braga de Souza e Dra. Gisely Cardoso de Melo pela colaboração e enriquecimento deste trabalho.

À Dr.^a Mônica Regina Farias Costa e Dr.^a Yonne Francis Chehuan Melo pelo espaço no laboratório de cultura, pela confiança depositada a mim. Juntamente com toda a sua equipe de pesquisadores, técnicos e demais funcionários.

Aos meus queridos amigos Elisangela, Ledjane, Jackeline, Márcia, Michele, Suelen, Tayná e Túlio que dividiram seus esforços e lutas comigo e estiveram presentes em momentos diversos durante toda esta fase.

Ao meu amado Hermes Alan Melgar Saldarriaga por todo amor, toda ajuda, esforço, compreensão e cobranças de sempre fazer e ser melhor.

À minha querida mãe, Maria José Siqueira da Costa, por todo amor, ensino, parceria. Este trabalho não teria concluído sem você. Ao meu querido pai, Braz e a meu irmão, David, vocês são o meu bem maior.

RESUMO

As espécies de *Plasmodium falciparum* e *P. vivax* são entes etiológicos importantes, causadores da malária humana e representam um dos maiores desafios para a saúde pública no mundo. Estes parasitas têm apresentado resistências aos antimaláricos atualmente disponíveis para tratamento. As principais classes de antimaláricos utilizados no mundo, os alcaloides quinolínicos e os derivados da artemisinina, devem suas origens às substâncias quinina e artemisinina, substâncias naturais isoladas de plantas antimaláricas. Os produtos naturais isolados de plantas da Amazônia são fontes promissoras de substâncias antimaláricas. Este trabalho objetivou a avaliação da susceptibilidade *in vitro* de isolados de campo de *P. falciparum* e *P. vivax* a extratos e substâncias isoladas de plantas antimaláricas da Amazônia brasileira. Estes isolados de campo de *P. falciparum* representam o genótipo e fenótipo dos parasitas que circulam nessa região atualmente. Foram estudadas as substâncias isoladas elipticina (**1**, alcaloide indólico), *O,O*-diacetil-4-nerolidilcatecol (**2**, terpeno-fenilpropanoide), neosergeolida (**3**, quassinóide), 6 α -acetoxigedunina (**4**) e 6 α -hidroxi-desacetilgedunina (**5** limonoides) e, os extratos brutos a partir de parte aérea de *Andropogon leucostachyus* (metanólico) e dos galhos e folhas de *Xylopia amazônica* (etanólico e clorofórmico, respectivamente). Esses produtos naturais já haviam sido caracterizados *in vitro* contra as cepas padronizadas de *P. falciparum*, e foram reavaliados no presente estudo contra cepas padronizadas K1 e 3D7 para fins de comparação. Foram utilizadas 32 isolados de campo de *P. vivax* e 2 isolados de campo de *P. falciparum*, esses últimos previamente estabilizados (MRV e AL). A determinação do efeito das substâncias isoladas, extratos e padrões de antimaláricos comerciais foi realizada aplicando-se o microteste e o DELI-teste (*Double-site enzyme-linked immunodetection*). A concentração inibitória 50% (CI₅₀) foi determinada contra as cepas MRV e AL de *P. falciparum* para **1**, **2**, **3**, **4** e **5** (CI₅₀ 0,48-0,77; 4,2-4,6; 0,004-0,01; 7,0-6,2 e 6,1-5,7 μ M, respectivamente) e os extratos de *A. leucostachyus*, *X. amazônica* (etanol e clorofórmio), (CI₅₀ 7,0-7,2; 9,8-9,5 e 7,8-7,4 μ g/mL, respectivamente). Dos 32 isolados de *P. vivax*, 24 isolados apresentaram curvas interpretáveis da CI₅₀, 12 desses isolados de *P. vivax* testados pelo microteste exibiram sensibilidade a **1**, **2**, **3**, **4** e **5** (CI₅₀ 2,19; 4,01; 0,13; 5,76 e 5,32 μ M, respectivamente) e os extratos de *A. leucostachyus*, *X. amazônica* (etanol e clorofórmio), (CI₅₀ 14,0; 15,7 e 13,6 μ g/mL, respectivamente). Os 12 isolados de *P. vivax* testados pelo DELI-teste exibiram sensibilidade a **1**, **2** e **3** (CI₅₀ 4,7; 9,0; e 0,01 μ M, respectivamente). Os isolados de campo apresentaram boa susceptibilidade aos produtos naturais testados em alguns casos, sendo **3** a substância mais ativa contra *P. falciparum* (CI₅₀ 0,004-0,01 μ M) e *P. vivax* (CI₅₀ 0,01-0,13 μ M). Os isolados de *P. vivax* foram pouco menos sensíveis que as cepas padronizadas de *P. falciparum* previamente estudadas frente às mesmas substâncias e extratos. Estes resultados mostram que os isolados de campo de *P. vivax* e *P. falciparum* apresentam perfis de sensibilidade diferentes aos produtos naturais e também aos antimaláricos comerciais. Embora os valores de CI₅₀ dos produtos naturais sejam maiores que aqueles encontrados para o *P. falciparum*, estas substâncias apresentaram boa atividade frente o *P. vivax*.

Palavras chave: produtos naturais, malária, elipticina, 4-nerolidilcatecol, *O,O*-diacetil-4-nerolidilcatecol, neosergeolida, 6 α -acetoxigedunina, 6 α -hidroxi-desacetilgedunina

ABSTRACT

The species *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* are important etiological agents that cause human malaria and represent one of the greatest challenges for public health in the world. These parasites present resistance to the antimalarials presently available for treatment. The main classes of antimalarials used in the world, namely the quinolone alkaloids and derivatives of artemisinin, owe their origins to the natural products quinine and artemisinin, isolated from antimalarial plants. Natural products isolated from antimalarial plants from the Amazon are promising sources of antimalarial substances. This work aimed to evaluate the *in vitro* susceptibility of field isolates of *P. falciparum* and *P. vivax* to extracts and substances isolated from antimalarial plants from the Brazilian Amazon. These *Plasmodium* field isolates represent the genotypes and phenotypes of the parasites that presently circulate in this region. The isolated compounds ellipticine (**1**, alkaloid indólico), *O,O*-diacetyl-4-nerolidylcatechol (**2**, terpene-phenylpropanoid), neosergeolide (**3**, quassinoid), 6 α -acetoxygedunina (**4**) e 6 α -hidroxydeacetilgedunina (**5**, limonoids) and the crude extracts of the aerial parts of *Andropogon leucostachyus* (methanol) and the branch ethanol and leaf chloroform extracts of *Xylopia amazônica*. These samples had previously been characterized *in vitro* against standardized strains of *P. falciparum* and were re-evaluated in the present study against the standardized K1 and 3D7 strains for comparative purposes. Thirty-two *P. vivax* field isolates and 2 previously stabilized *P. falciparum* field isolates (MRV and AL) were used. The effects of the isolated substances, extracts and commercial antimalarial standards were determined by applying the microtest and the DELI (Double-site enzyme-linked immunodetection) test. The median inhibitory concentration (IC₅₀) was determined against *P. falciparum* strains MRV and AL for **1**, **2**, **3**, **4** and **5** (IC₅₀ 0.48-0.77; 4.2-4.6; 0.004-0.01; 7.0-6.2 and 6.1-5.7 μ M, respectively) and *A. leucostachyus* and *X. amazônica* ethanol and chloroform extracts IC₅₀ 7.0-7.2, 9.8-9.5 and 7.8-7.4 μ g/mL, respectively). Of 32 *P. vivax* field isolates, 24 exhibited curves from which IC₅₀ were interpretable. Twelve of these *P. vivax* isolates were evaluated using the microtest and exhibited sensitivity to **1**, **2**, **3**, **4** and **5** (IC₅₀ 2.19; 4.01; 0.13; 5.32 and 5.76 μ M, respectively) and *A. leucostachyus* and *X. amazônica* ethanol and chloroform extracts (IC₅₀ 14.0, 15.7 and 13.6 μ g/mL, respectively). The 12 *P. vivax* field isolates evaluated using the DELI-test also exhibited sensitivity to **1**, **2** and **3** (IC₅₀ 4.7; 9.0; and 0.01 μ M, respectively). The field isolates exhibited good susceptibility to the natural products tested in some cases. Substance **3** was the most active against *P. falciparum* (IC₅₀ 0,004-0,01 μ M) and *P. vivax* (IC₅₀ 0,01-0,13 μ M). The *P. vivax* field isolates were only a little less sensitive than the standardized strains of *P. falciparum* used in previous studies of these same substances and extracts. These results show that *P. vivax* and *P. falciparum* field isolates exhibit different sensitivity profiles with respect to the natural products evaluated as well as to commercially-available antimalarials. Despite the larger IC₅₀ values exhibited against *P. vivax* versus *P. falciparum* field isolates, the natural products investigated exhibited good antiplasmodial activity against *P. vivax*.

Key-words: natural products, malaria, ellipticine, 4-nerolidylcatechol, *O,O*-diacetyl-4-nerolidylcatechol, neosergeolide, 6 α -acetoxygedunina, 6 α -hidroxydeacetilgedunina

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição da malária em países e territórios do ano 2000 e a situação até 2016.	19
Figura 2 - Ciclo biológico de <i>Plasmodium</i> spp.	22
Figura 3 - Etapas do DELI-test.	33
Figura 4 - Estruturas das substâncias elipticina (1), 4-Nerolidilcatecol (2), 4-Nerolidilcatecol diacetilado (3), Isobruceína B (4), Neosergeolida (5), 6 α -acetoxigedunina (6) e 6 α -hidroxi-deacetilgedunina (7).	50
Figura 5 - Fluxograma dos procedimentos do presente trabalho	52
Figura 6 - Viabilidade no cultivo <i>in vitro</i> com isolados de <i>P. vivax</i> utilizando meio Waymouth (6a) e o meio McCoy (6b).	66
Figura 7 - Três momentos de um microteste com isolados de campo de <i>P. vivax</i> nas formas de trofozoítos jovem e maduro (7a); pré-esquizontes (7b) e esquizontes (7c).	67
Figura 8 - Microteste após 48 horas com duas cepas de <i>P. falciparum</i> K1 (8a) e 3D7 (8b) e dois isolados de campo de <i>P. falciparum</i> AL (8c) e MRV (8d).	68
Figura 9 - Distribuição dos resultados de cultura limitada de <i>P. vivax</i> após o período de incubação.	68
Figura 10 - Intervalos de confiança bootstrap das amostras testadas com <i>P. falciparum</i> .	74
Figura 11 - Intervalos de confiança bootstrap para as doses de drogas no experimento com <i>P. vivax</i> .	78

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Meios de cultura atualmente utilizados para <i>P. falciparum</i> .	27
Quadro 2 – Meios de cultura atualmente utilizados para <i>P. vivax</i> .	28
Quadro 3 – O tratamento para <i>P. vivax</i> .	36
Quadro 4 – O tratamento para <i>P. falciparum</i> .	37
Quadro 5 – Classificação das drogas antimaláricas de acordo com o grupo químico e o local de ação no ciclo do parasito.	38
Quadro 6 – Primeiros casos registrados da resistência no mundo pelo <i>P. falciparum</i> aos antimaláricos.	43
Quadro 7 – Origem dos antimaláricos quinolínicos e derivados da artemisinina.	46
Quadro 8 – Principais plantas amazônicas investigadas para atividade antimalárica pelo grupo de pesquisas em Manaus.	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Cepas Padrão de <i>P. falciparum</i>	53
Tabela 2 – Valores das sete diferentes concentrações dos produtos naturais e drogas padrão.	58
Tabela 3 – Concentrações inibitórias 50% (CI ₅₀) de duas cepas padronizadas e dois isolados de campo de <i>P. falciparum</i> frente a drogas padrão, produtos naturais e derivados semi-sintéticos pelo microteste.	71
Tabela 4 – Média das concentrações inibitórias 50% (CI ₅₀) de isolados de campo de <i>P. vivax</i> frente a drogas padrão, produtos naturais e derivado semi-sintético pelo Microteste e DELI-test.	76
Tabela 5 – Análises descritivas das variáveis envolvidas no experimento com <i>P. vivax</i> .	77
Tabela 6 – Comparações múltiplas de Bonferroni no experimento com <i>P. vivax</i> .	78

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ACT	Terapia de combinação com derivados de artemisinina
AL	<i>Andropogon leucostachyus</i> (extrato)
APAD	3-acetil piridina adenina dinucleotídeo
BSA	Albumina de soro bovino
DELI-Teste	<i>Double-site enzyme-linked immunodetection</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FMT-HVD	Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado
HEPES	Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N-2-etanosulfônico
HRP2	Proteína 2 rica em histidina
CI ₅₀	Concentração inibitória 50%
INPA	Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
LAPAAM	Laboratório de Princípios Ativos da Amazônia
LDH	Lactato desidrogenase
MAb	Anticorpo monoclonal
MDR	Multidrug resistance
MR4	Malaria Research and Reference Reagent Resource Center
NAD	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Fosfato com salina tamponada
pLDH	Lactado desidrogenase plasmodial
rpm	rotações por minuto
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RPSM	Material residual de semente prensado
S	Sensível
TMB	3,3', 5,5'-Tetrametilbenzidina
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
WHO	World Malaria Report

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 Malária	18
2.2 Epidemiologia da Malária	19
2.2.1 Malária no mundo	19
2.2.2 Malária no Brasil	20
2.2.3 Malária no Amazonas	20
2.2.4 Malária em Manaus	21
2.2.5 Fatores que influenciam a transmissão	21
2.3 Ciclo evolutivo de <i>Plasmodium</i> spp.	22
2.3.1 Ciclo biológico do parasito no homem	22
2.3.2 Ciclo biológico do parasito no mosquito	24
2.4 Virulência do <i>P. falciparum</i> e <i>P. vivax</i>	25
2.5 Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Plasmodium</i> spp.	26
2.5.1 Cultivo <i>in vitro</i> de <i>P. falciparum</i>	27
2.5.2 Cultivo <i>in vitro</i> de <i>P. vivax</i>	27
2.6 Métodos para avaliação da sensibilidade <i>in vitro</i> do parasito	29
2.6.1 Macroteste e microteste	29
2.6.2 Incorporação de hipoxantina tritiada	30
2.6.3 Citometria de fluxo	30
2.6.4 Métodos imunoenzimáticos	31
2.6.4.1 Testes baseados em HRP2	31
2.6.4.2 Testes baseados em pLDH	32
2.7 Teste de sensibilidade <i>in vitro</i> com <i>P. vivax</i>	33
2.8 Tratamento da malária	35
2.9 Características das drogas antimaláricas	38
2.10 Resistência de <i>Plasmodium</i> spp. aos antimaláricos	42
2.10.1 Resistência de <i>P. Falciparum</i>	42
2.10.2 Resistência de <i>P. Vivax</i>	43
2.11 Plantas como fonte de novos antimaláricos	45
2.12 Plantas Antimaláricas Amazônicas	46
3 OBJETIVOS	51

3.1 Geral	51
3.2 Específicos	51
4 METODOLOGIA	52
4.1 Local de estudo	52
4.2 Amostra de <i>Plasmodium</i>	53
4.2.1 Cepas padrão de <i>P. falciparum</i>	53
4.2.2 Isolados de campo de <i>P. falciparum</i>	53
4.2.3 Isolados de campo de <i>P. vivax</i>	54
4.3 A aprovação ética	54
4.4 Obtenção das substâncias químicas e extratos vegetais	55
4.4.1 Obtenção do alcaloide indólico elipticina	55
4.4.2 Obtenção do derivado fenilpropanoide <i>O,O</i> -diacetil-4-nerolidilcatecol	55
4.4.3 Obtenção do quassinóide neosergeolida	56
4.4.4 Obtenção dos limonoides 6 α -acetoxigedunina e seu derivado 6 α -hidroxi- deacetilgedunina	56
4.4.5 Obtenção dos extratos vegetais a partir da <i>Andropogon leucostachyus</i> e <i>Xylopia amazônica</i>	56
4.5 Obtenção das drogas padrão	57
4.6 Preparação das soluções estoques	57
4.6.1 Preparação das soluções estoques dos produtos naturais	57
4.6.2 Preparação das soluções estoques das drogas padrões	57
4.7 Diluições das drogas, substâncias químicas e extratos para obtenção das concentrações testes	58
4.8 Cultivo <i>in vitro</i> do <i>P. falciparum</i> e microteste de susceptibilidade <i>in vitro</i>	58
4.8.1 Descongelamento das cepas padrão e dos isolados de campo	58
4.8.2 Manutenção da cultura de <i>P. falciparum</i>	59
4.8.3 Microteste de susceptibilidade <i>in vitro</i>	60
4.8.3.1 Método por análise microscópica	60
4.8.3.2 Análise dos dados	61
4.9 Teste <i>in vitro</i> com isolados de campo de <i>P. vivax</i>	61
4.9.1 Meios de cultura para <i>P. vivax</i>	61
4.9.2 Preparação da suspensão de hemácias parasitados	62

4.9.3 Técnica do DELI-test (<i>double-site enzyme linked LDH immunodetection</i>)	62
4.9.3.1 Cálculo da concentração inibitória 50% (CI ₅₀)	64
4.9.4 Análise estatística	64
5 RESULTADO E DISCUSSÃO	65
5.1 Viabilidade do <i>Plasmodium</i> em meios de cultura diferentes	65
5.1.1 Viabilidade dos meios de cultura para <i>P. vivax</i>	65
5.1.2 Viabilidade do meio de cultura para <i>P. falciparum</i>	66
5.2 Avaliação da cultura dos <i>Plasmodium</i> pelo microteste	67
5.3 Maturação	69
5.4 Atividade antimalárica <i>in vitro</i> das drogas padrão, substâncias químicas e extratos vegetais	69
5.5 Susceptibilidade de isolados de campo de <i>P. vivax</i> a produtos naturais	75
6 CONCLUSÃO	82
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83
ANEXO 1	101
ANEXO 2	102

1 INTRODUÇÃO

A malária é considerada um grave problema de saúde pública no mundo por atingir 216 milhões de pessoas nas zonas tropicais e subtropicais do planeta e por ainda causar alta morbidade e mortalidade nessas regiões com 445.000 mortes no ano de 2016 (WHO, 2017). A malária é causada por aproximadamente cinco espécies de protozoário do gênero *Plasmodium*, sendo que o *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium vivax* representam maior desafio para a saúde pública no mundo (WHO, 2015).

Ao *P. falciparum* são atribuídos alguns fatores de virulência relacionados à sua sobrevivência que têm sido associados à capacidade de eritrócitos infectados aderirem à parede endotelial (PARKER *et al.* 2004). A adesão ao endotélio contribui para a patogenicidade da doença, causando obstrução de pequenos vasos e contribuindo para a falha de múltiplos órgãos, malária cerebral, coma e morte (MILLER *et al.* 1994). Considerado por muito tempo como malária benigna, o *P. vivax* tem sido descrito em vários relatórios como causa de malária grave (NAING *et al.* 2014). Uma limitação no estudo do *P. vivax* é a dificuldade de cultivo contínuo *in vitro* em laboratório, o que não permite a obtenção de grandes quantidades do parasito, desta forma restringe o conhecimento mais aprofundado desta espécie (NOULIN *et al.* 2013).

Além dos fatores de gravidade em ambas as espécies, há o surgimento e a propagação da resistência dos *Plasmodium* aos antimaláricos utilizados para tratamento sendo relatada em muitos lugares no mundo (GONÇALVES *et al.* 2014), incluindo o Brasil (PRATT-RICCIO *et al.* 2013), representando, portanto, um importante desafio no controle da malária. Diante disso, existe a necessidade da busca por novas drogas que possuam mecanismos de ação diferente dos que são utilizados (GAMA *et al.* 2011). Testes com novas substâncias isoladas de plantas e seus derivados constituem uma ferramenta importante na descoberta de novas drogas (SILVA *et al.* 2011).

Ensaio *in vitro* de sensibilidade do *P. falciparum* aos antimaláricos já estão muito bem estabelecidos no mundo o que têm permitido monitorar o aparecimento e dispersão de isolados resistentes a várias drogas. Estudos relacionados ao *P. vivax*, no entanto são menos frequentes devido às limitações em cultivo *in vitro*. Contudo, a alta prevalência de *P. vivax* em várias partes do mundo e os frequentes casos graves por malária *vivax*, aumentou a preocupação em relação a este parasito. Portanto o *P. vivax*

ainda representam um grande desafio (CHEHUAN *et al.* 2013; LARÊDO, 2007; NOEDL *et al.* 2003).

Diante disto foi proposta deste trabalho avaliar a susceptibilidade *in vitro* de isolados de campo do *P. vivax*, assim como a avaliação de cepas e isolados de campo previamente estabilizados de *P. falciparum* frente às substâncias químicas e extratos isolados de plantas antimaláricas que já haviam sido estudados *in vitro* para cepas padrão de *P. falciparum*. A avaliação *in vitro* de isolados de campo de *Plasmodium* revelam o genótipo e fenótipo dos parasitos que atualmente circulam na região.

Os compostos químicos de origem natural são fontes promissoras na descoberta de novos medicamentos para diversas doenças, uma vez que a diversidade química e as propriedades moleculares fazem deles verdadeiros alvos de estudo (KAUR *et al.* 2009; SCHMIDT *et al.* 2012). Os produtos naturais e seus derivados são utilizados como principais fontes na busca de novos fármacos e ainda representam a maioria dos produtos farmacêuticos.

A região Amazônica é considerada endêmica para as espécies de *P. falciparum* e *P. vivax*, tendo uma tradição rica e variedade de plantas antimaláricas em uso pelas populações locais cujos extratos e princípios ativos foram a base dessa busca para agentes antimaláricos para tratamento de infecções por *P. falciparum* e *P. vivax*. Várias plantas da região são utilizadas popularmente para o tratamento da malária (PINTO *et al.* 2009; HENRIQUE *et al.* 2010) como por exemplo, a peroba/carapanaúba, caapeba, caferana entre outros que já tiveram isolados seus produtos naturais com atividade antimalárica *in vitro* comprovada utilizando cepas de *P. falciparum* com ótimos índices inibitórios assim também como *in vivo* para *P. berghei* (ANDRADE-NETO *et al.* 2007; ROCHA E SILVA *et al.* 2011; ROCHA E SILVA *et al.* 2012a).

Os resultados obtidos neste estudo com o *P. vivax* são inéditos, pois até o momento a avaliação da suscetibilidade dos isolados de campos a produtos naturais foi realizada somente com cepas e isolados de campo de *P. falciparum*. A implantação do teste antimalárico *in vitro* para avaliação do efeito da droga sobre o parasito representa um importante avanço científico para este grupo de pesquisa e para toda a região, uma vez que contribuirá com novas alternativas para o arsenal terapêutico de tratamento da malária.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Malária

A malária é uma doença infecciosa febril aguda, não contagiosa causada por protozoários pertencentes ao filo Apicomplexa, classe Sporozoea, ordem Eucoccidiida, família Plasmodiidae, gênero *Plasmodium* (VERONESI-FOCACCIA 2009). Quatro espécies de *Plasmodium* são bem conhecidas por causar malária humana, estas são o *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* e *P. malariae* (WHO, 2015). A quinta, *P. knowlesi*, foi recentemente documentada e ocorre quando um mosquito do gênero *Anopheles* infectado por um macaco infecta seres humanos (transmissão zoonótica) (DANESHVAR *et al.* 2009; WHO, 2015).

Os parasitos da malária são transmitidos aos humanos pela picada da fêmea infectada do mosquito do gênero *Anopheles*. Há cerca de 400 espécies diferentes de mosquitos *Anopheles*, apenas 30 espécies são importantes como vetores de malária humana (SINDEN *et al.* 2004; GUTTERY *et al.* 2012). Estudos realizados na Amazônia mostraram a importância da transmissão da malária nesta região, onde o *Anopheles darlingi* foi a espécie altamente suscetível ao *Plasmodium*, sendo considerado o vetor principal de transmissão da malária nesta área (TADEI; DUTARY THATCHER, 2000).

Os primeiros sintomas da malária são inespecíficos e podem ser confundidos com os de várias outras doenças, como: dor de cabeça, mialgia, fraqueza, tontura, náuseas e vômitos. As manifestações clínicas variam de acordo com a espécie de plasmódio e o estado imunológico do hospedeiro. Em geral, esses quadros são acompanhados por uma sensação de frio, tremor, suor e hipertermia. Nos casos complicados, podem ocorrer dores abdominais fortes, sonolência e redução da consciência e até coma, como na malária cerebral (FERREIRA; VERONESI 2005; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

2.2 Epidemiologia da Malária

2.2.1 Malária no mundo

Milhões de pessoas ainda não têm acesso aos serviços necessários para prevenir e tratar a malária. Em 2016 ocorreram 216 milhões de novos casos que levaram a 445.000 mortes. A maioria dos casos de malária em 2016 ocorreu principalmente na região africana (90%), seguidos pela região do sudeste asiático (7%) e a região do mediterrâneo oriental (2%) (WHO, 2017) (Figura 1). Aproximadamente 80% das mortes por malária estão concentradas em 15 países, principalmente no continente Africano onde se concentraram a maioria dos casos no ano de 2015 (88%), seguido pela região do sudeste asiático (10%) e do mediterrâneo oriental (2%) (WHO, 2016).

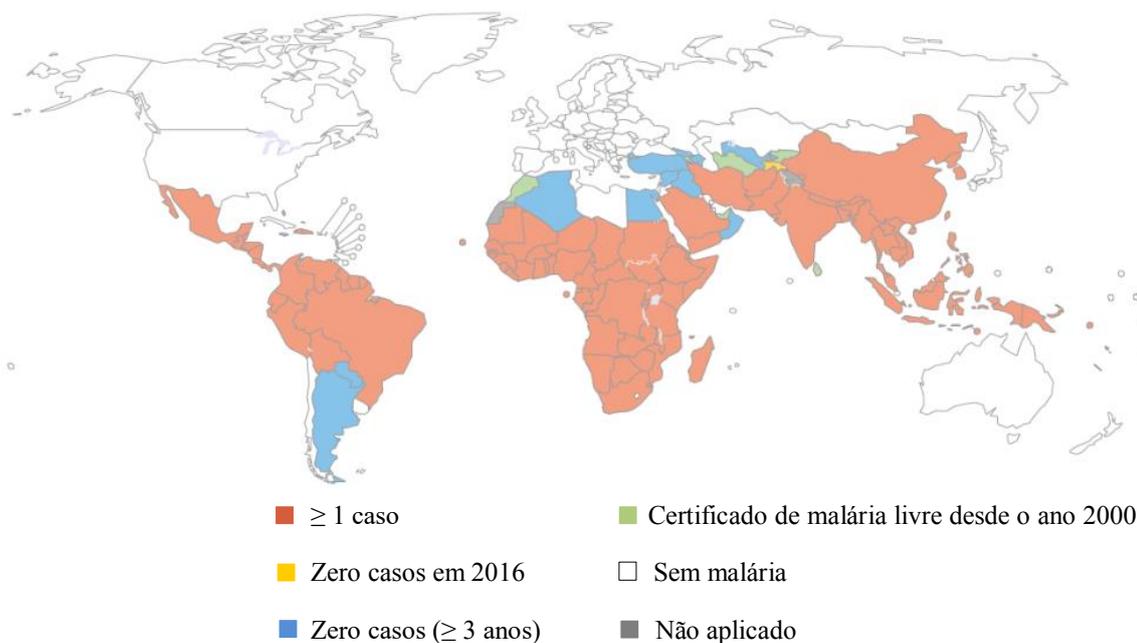


Figura 1 – Distribuição da malária em países e territórios do ano 2000 e a situação até 2016.

FONTE: Adaptado -WHO, 2017.

Quanto à distribuição em relação às espécies de parasitos, o *P. falciparum* é o mais prevalente na África Subsaariana representando em 2016, 99% dos casos, sendo o responsável pela maioria das mortes por malária (WHO, 2017). Esta espécie de parasito não é capaz de se desenvolver no mosquito vetor *Anopheles* em climas temperados, por isso a concentração de ocorrências é em apenas determinadas áreas (MANDAL *et al.* 2014).

O *P. vivax* é o que possui maior distribuição no mundo, com exceção da África, ocorrendo principalmente nas Américas, é responsável por 64% dos casos de malária e está acima de 30% na região do sudeste asiático e 40% na região do mediterrâneo oriental (WHO, 2017). A distribuição geográfica mais ampla desta espécie deve-se a tolerância de climas tropicais e temperados (BATTLE *et al.* 2012; WHO, 2015). Em todas as regiões onde a malária é endêmica tem sido relatado casos graves e mortes por *P. vivax*. Globalmente, em 2015 o número total de mortes por *P. vivax* foi estimado entre 3,5 - 16% ocorrendo fora da África subsaariana (WHO, 2015).

2.2.2 Malária no Brasil

No Brasil, três espécies de *Plasmodium* causam a malária humana: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, sendo as infecções por *P. vivax* predominantes, seguido das infecções por *P. falciparum*. Casos de outras espécies, como o *P. ovale* que ocorre apenas no continente africano e o *P. knowlesi* no Sudeste Asiático, podem, ocasionalmente, ser importados de outros países e diagnosticados no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

Em 2017 o Brasil registrou 174.522 casos de malária na região Amazônica composta pelos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins que concentram 99,5% dos casos de malária do país. Em relação ao ano anterior - registrou 117.832 casos da doença - houve um aumento de 48%. O Estado mais afetado foi o Amazonas, com cerca de 74 mil casos em 2017, seguido por Pará e Acre (OPAS/OMS 2018).

2.2.3 Malária no Amazonas

No estado do Amazonas em 2016 foram registrados 49.928 casos de malária com 4 óbitos (BOLETIM DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE/FVS 2016). De janeiro a setembro de 2016 ocorreram 29.998 casos de malária por *P. vivax* e 2.026 casos por *P. falciparum*. O *P. malariae* foi raramente observado (SIVEP-Malária, 2016).

2.2.4 Malária em Manaus

Entre janeiro e agosto de 2017 foram registrados 7.079 casos de malária em Manaus. No ano de 2016 foram registrados 8.476 casos, com 1 óbito (BOLETIM DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE/FVS 2016). Predominam os casos por *P. vivax* registrado de janeiro a setembro de 2016 com 7.311 e 39 casos por *P. falciparum* (SIVEP-Malária, 2016). A Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) considerada centro de referência para o tratamento de enfermidades tropicais, possui importante participação no diagnóstico e tratamento da malária no Município de Manaus, sendo notificados em 2017, 3895 casos de malária atendidos na Fundação. Destes 3840 foram causados por *P. vivax*, 44 por *P. falciparum* e 11 por malária mista (*P. vivax* + *P. falciparum*) (SIVEP-Malária, 2018).

2.2.5 Fatores que influenciam a transmissão

Vários fatores combinados favorecem a transmissão da doença e a distribuição quanto às espécies na região Amazônica. Um desses são as mudanças climáticas e os movimentos migratórios devido à ocupação desordenada dos subúrbios de grandes cidades da região. Além dos consequentes desmatamentos para exploração madeireira, a pecuária, a agricultura, os assentamentos não oficiais contribuem para esse fenômeno. Outro contribuinte é o aumento da população de vetores do mosquito com os frequentes tanques abandonados utilizados para piscicultura nos quintais de casas ou na periferia de várias cidades (OLIVEIRA-FERREIRA *et al.* 2010).

2.3 Ciclo evolutivo de *Plasmodium* spp.

O ciclo evolutivo do *Plasmodium* se caracteriza por apresentar duas fases distintas de reprodução, conforme representado na Figura 2.

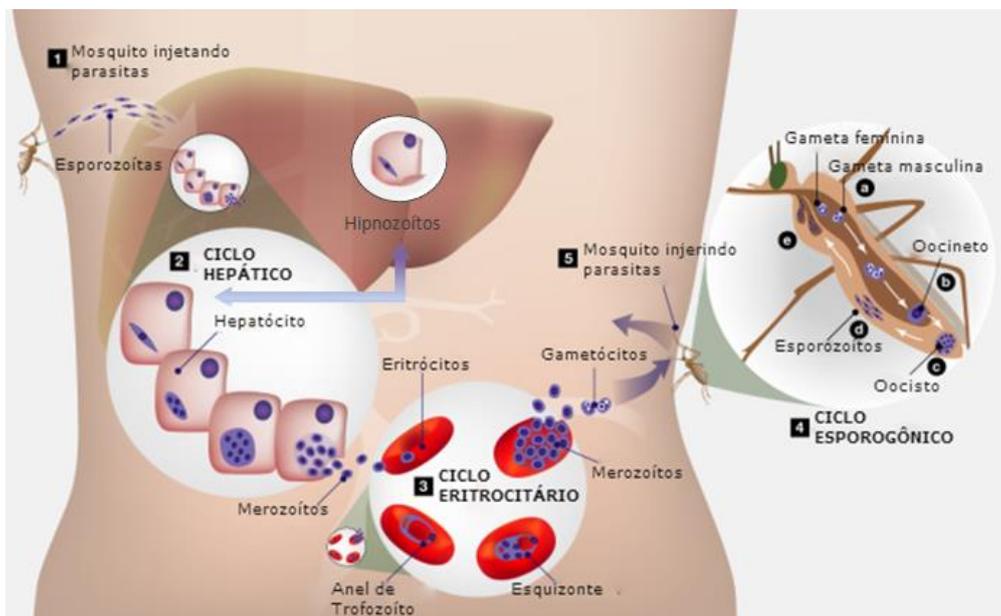


Figura 2 - Ciclo biológico de *Plasmodium* spp.

FONTE: MARUDG, 2010.

2.3.1 Ciclo biológico do parasito no homem

Inicia-se a infecção malárica quando o mosquito fêmea infectado pica o hospedeiro. Durante este processo, o mosquito injeta saliva contendo anticoagulantes para facilitar a ingestão de sangue (PRUDENCIO *et al.* 2006). Os esporozoítos, formas infectantes contidas nas glândulas salivares do mosquito, são inoculados nos tecidos dérmicos do hospedeiro. Estes esporozoítos são móveis e capazes de penetrar pequenos vasos sanguíneos, estimulando uma resposta imunitária do hospedeiro (SINNIS; ZAVALA, 2008; GUILBRIDE *et al.* 2012).

Do sangue circulante os esporozoítos são varridos para os vasos sinusóides do fígado, onde eles penetram através dos fagócitos conhecidos como células de Kupffer para iniciar o ciclo hepático ou exoeritrocítico (AMINO *et al.* 2006; FREVERT *et al.* 2008). Os esporozoítos que penetram o hepatócito diferenciam-se em pequenos trofozoítos, crescendo em tamanho tornando-se esquizontes multinucleados em 5 dias. Os esquizontes maduros diferenciam-se em milhares de merozoítos que são liberados dos hepatócitos infectados como merossomos, pacotes de centenas de parasitos cercados

por membrana da célula hospedeira que vão se romper e fluir para a circulação dos vasos sinusóides do fígado (PRUDENCIO *et al.* 2006; STURM *et al.* 2007). Os merossomos são transportados para a circulação sanguínea liberando os merozoítos presos, que em seguida invadirão os eritrócitos para iniciar o ciclo eritrocítico, também conhecido como o ciclo de estágio sanguíneo (BAER *et al.* 2007).

No fígado, os esporozoítos da espécie de *P. vivax* que se diferenciaram em trofozoítos podem assumir vias diferentes, alternativamente, os pequenos trofozoítos se tornam dormentes e podem permanecer neste estado de repouso metabólico durante semanas, meses ou até anos em um hepatócito, responsáveis pela malária recidivante, podem desenvolver a forma latente denominado hipnozoítos (BARNWELL; GALINSKI 1998; CARLTON *et al.* 2008).

A fase hepática do ciclo de vida dos *Plasmodium* é denominada esquizogônica primária, e nesta fase não se encontram parasitos na circulação. Os merozoítos liberados no sangue dos sinusóides hepáticos invadem os eritrócitos. O *P. malariae* só invade hemácias maduras (0,1% do total), o *P. vivax* invade preferencialmente reticulócitos e o *P. falciparum*, hemácias em qualquer fase evolutiva (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010; LI; HAN, 2012).

Após invadir os eritrócitos, os merozoítos se diferenciam em trofozoítos jovens e começa a remodelação anucleada dos eritrócitos para fornecer um ambiente apropriado para crescer durante um período de 48 a 72 horas alimentando-se da hemoglobina dos eritrócitos parasitados. Em determinado momento esses trofozoítos conhecidos como formas em anel, crescem, se tornando irregulares e, aparecem sinais de divisão de núcleo para criar o esquizonte. Ao longo das próximas 8 ou mais horas continua a divisão nuclear e posterior segmentação, originando um número variável de merozoítos hemáticos que invadirão novos eritrócitos. Este processo de multiplicação assexuada se chama esquizogonia eritrocítica (BRUCE *et al.* 1990; REININGER *et al.* 2012).

Depois de algumas gerações de merozoítos sanguíneos, ocorre a diferenciação em estágios sexuais macho ou fêmea, micro ou macro gametócitos, respectivamente, e não em trofozoítos assexuados. Esses gametócitos não mais se dividem e seguirão seu desenvolvimento no mosquito vetor, dando origem aos esporozoítos (SILVESTRINI *et al.* 2000; VALE *et al.* 2005).

Durante o ciclo de vida assexuada do parasito dentro do hospedeiro, este exhibe uma grande diversidade em seu ciclo, variando de crescimento assíncrono a ciclos sincronizados. As infecções sincronizadas podem ser favorecidas quando há competição por células vermelhas do sangue em infecções únicas, assim amenizam mudanças extremas na densidade do parasito, contudo nas coinfeções, a competição desfavorece as cepas síncronas (GREISCHAR *et al.* 2012). Os parasitos do *Plasmodium falciparum* tendem a crescer em sincronicidade durante o desenvolvimento intraeritrocítico cíclico *in vivo*. Touré-ndouo *et al.* (2009) demonstrou que essa sincronicidade do parasito *in vivo* está fortemente associada à infecção por um único gene da família alélica.

2.3.2 Ciclo biológico do parasito no mosquito

Durante o repasto sanguíneo, a fêmea do mosquito *Anopheles* ingere as formas sanguíneas do parasito, mas somente os gametócitos serão capazes de evoluir no inseto, dando origem ao ciclo sexuado ou esporogônico (Figura 2). No intestino médio do mosquito, os gametócitos perdem sua cobertura externa da membrana eritrocítica e tornam-se sexualmente estimulados. O gametócito masculino passa por um processo denominado exflagelação que dá origem a microgametas e o gametócito feminino transforma-se em macrogameta. O núcleo do microgameta divide-se em oito núcleos e oito corpos flagelados são formados (CARTER; NIJHOUT, 1977; PRASAD *et al.* 2011).

Quando um microgameta fecunda um macrogameta um zigoto diplóide é formado durante um período de 24-36 horas. Este se transforma em uma forma móvel (oocineto) que penetra no intestino médio do mosquito formando o oocisto, onde é submetido a várias divisões nucleares para formar uma cápsula alongada de vários milhares de esporozoítos. Na maturidade, a cápsula se abre liberando milhares de esporozoítos na hemocele do mosquito, que, em seguida migram e penetram as glândulas salivares e permanecem nos espaços glandulares esperando até que o mosquito procure uma refeição de sangue (EJIGIRI; SINNIS, 2009). O tempo requerido para que se complete o ciclo esporogônico nos insetos varia com a espécie de *Plasmodium* e com a temperatura, situando-se geralmente em torno de 10 a 12 dias. (WEATHERALL *et al.* 2002).

2.4 Virulência do *P. falciparum* e *P. vivax*

Das espécies de *Plasmodium* que causam malária humana o *P. falciparum* é a mais virulenta. Essa virulência tem sido associada à adesão de eritrócitos infectados no endotélio. Há ausência de alguns estágios maduros na circulação do sangue periférico, pois estes conseguem se aderir no endotélio de veias e microcapilares de vários órgãos como pulmão, coração, cérebro, fígado e rim (KYES *et al.* 2001; SCHERF *et al.* 2008; AUTINO *et al.* 2012). Sendo assim, desaparece essas formas da corrente sanguínea periférica, processo denominado "sequestro" (WAHLGREN *et al.* 1999; MILLER *et al.* 2002; PARKER *et al.* 2004; BONNEFOY *et al.* 2008).

Durante o seu ciclo de vida de 48 h, os parasitos podem permanecer sequestrado por 24 h na microvasculatura profunda. Desta maneira, escapam de ser destruído no baço, o que torna o diagnóstico mais difícil, já que eles não são vistos no sangue periférico (AUTINO *et al.* 2012). O sequestro de parasito é visto como a base patológica da manifestação grave de malária em *P. falciparum*, incluindo malária cerebral (GRAU *et al.* 2012).

O *P. vivax* como os outros parasitos da malária recidivante tem atributos únicos para sua sobrevivência desenvolvendo-se em hipnozoítos no fígado como estratégia para assegurar o ciclo de vida em climas temperados com a finalidade de infectar mosquitos no final da primavera e início do verão (WHITE, 2011; GALINSKI *et al.* 2013). Esta fase de longa duração permite ao parasito permanecer dormente por períodos prolongados (MARKUS *et al.* 2015). Este mecanismo estaria relacionado às recorrentes infecções, resultando na falha terapêutica (GENTON *et al.* 2008; TJITRA *et al.* 2008).

Outra estratégia do *P. vivax* é invadir preferencialmente os reticulócitos (células jovens), cuja invasão justifica a hipótese de malária benigna, pois limita os níveis de parasitos no sangue (KITCHEN, 1938; GALINSKI *et al.* 1992; KOSAISAVEE *et al.* 2011; LI; HAN, 2012). Além dessas, gametócitos do *P. vivax* podem se desenvolver rapidamente e circular no início de uma infecção aguda, tal condição permite a transmissão do parasito antes do paciente se sentir gravemente doente e procurar tratamento (BOUSEMA; DRAKELEY, 2011).

As formas maduras de *P. vivax* são frequentemente observadas em amostras de sangue periférico, portanto, concluiu-se que o sequestro não ocorre com este parasito. Porém há uma adesão de algumas formas maduras com a evidência da ausência de esquizontes no sangue periférico (CARVALHO *et al.* 2010; CHOTIVANICH *et al.* 2012; LOPES *et al.* 2014).

Dependendo de onde ocorre a adesão, além de outros fatores, podem ocorrer algumas complicações e levar o paciente à morte. Se a adesão ocorrer no pulmão, causa a síndrome respiratória aguda; se no cérebro, causa a malária cerebral (KOCHAR *et al.* 2005; GENTON *et al.* 2008; TJITRA *et al.* 2008; ANSTEY *et al.* 2009), se na placenta malária gestacional com baixo peso do bebê ao nascer devido à infecção placentária (NOSTEN *et al.* 1999), além da ocorrência de trombocitopenia grave (ANTINORI *et al.* 2016). Contudo essas complicações outrora vistas com *P. falciparum* agora são observadas em pacientes infectados por *P. vivax*. Isso levanta a possibilidade de que os processos patológicos ligados a citoadesão também podem operar em *P. vivax* (CARVALHO *et al.* 2010).

2.5 Cultivo *in vitro* de *Plasmodium* spp.

As investigações *in vitro* com *Plasmodium* spp. eram limitadas, principalmente pela indisponibilidade de método apropriado de cultivo para a produção de biomassa parasitária suficiente na realização das técnicas. A possibilidade de manter *in vitro* cepas de *P. falciparum* em cultura contínua revolucionou as investigações sobre a malária humana, dando início a uma nova fase de grande importância no estudo da malária (DIGGS *et al.* 1975; TRAGER; JENSEN, 1976).

O desenvolvimento de cultura contínua *in vitro* torna possível a retirada dos parasitos do hospedeiro e sua transferência a um ambiente experimental controlado. Para o cultivo *in vitro* do parasito é necessária a simulação das mesmas condições em que o parasito se desenvolve. Como em cada fase do ciclo, o parasito passa por condições diferentes, tais como tecido parasitado, temperatura e os líquidos com os quais entram em contato, de acordo com a fase que se deseja cultivar, as condições devem ser adaptadas principalmente na fase eritrocítica do ciclo de vida do *Plasmodium* (SCHUSTER *et al.* 2002).

2.5.1 Cultivo *in vitro* de *P. falciparum*

A cultura contínua *in vitro* de *P. falciparum* é facilmente realizada e requer pouco equipamento de laboratório. Embora ocorram alguns desafios técnicos é uma ferramenta essencial para pesquisa básica, pela capacidade de se criopreservar parasitos vivos, podendo tê-los em altas densidades, além da possibilidade de clonagem (DIGGS *et al.* 1975; NOEDL *et al.* 2003).

O cultivo contínuo *in vitro* de *P. falciparum* foi descrito pela primeira vez em 1976 utilizando meio RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640, tamponado com HEPES (Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N-2-etanosulfônico) e suplementado com soro (TRAGER; JENSEN, 1976).

A partir do desenvolvimento da cultura de *Plasmodium* por Trager e Jensen (1976) foi desenvolvido o aperfeiçoamento da técnica de cultura. Atualmente a composição dos meios de cultura (Quadro 1) são basicamente, esses:

CHEN <i>et al.</i> 2014	LEBA <i>et al.</i> 2015
<ul style="list-style-type: none"> • Meio RPMI-1640, HEPES, hipoxantina, gentamicina, albumaxII, bicarbonato de sódio 	<ul style="list-style-type: none"> • Meio RPMI-1640, albumaxII, gentamicina
<ul style="list-style-type: none"> • 5% hematócrito 	<ul style="list-style-type: none"> • 4% hematócrito
<ul style="list-style-type: none"> • 6% soro humano 	<ul style="list-style-type: none"> • 2% soro humano
<ul style="list-style-type: none"> • Culturas mantidas a 37°C em frascos de poliestileno 	<ul style="list-style-type: none"> • Culturas mantidas a 37°C em frascos de poliestileno
<ul style="list-style-type: none"> • 3% O₂, 5% CO₂, 92% N₂ 	<ul style="list-style-type: none"> • 5 % O₂, 5% CO₂, 90% N₂

Quadro 1 – Meios de cultura atualmente utilizados para *P. falciparum*.

2.5.2 Cultivo *in vitro* de *P. vivax*

Uma limitação no estudo da biologia de *P. vivax* é a falta de um sistema de cultivo contínuo *in vitro* conveniente. Isso é, em partes, devido à preferência/seletividade em invadir células vermelhas jovens, os reticulócitos. A concentração de reticulócitos no sangue periférico é relativamente baixa (2% do total de glóbulos vermelhos). O cultivo contínuo de *P. vivax* dependeria de reticulócitos para maturação dos parasitos (KITCHEN *et al.* 1938; BORLON *et al.* 2012). Outra limitação importante é a necessidade de ter isolados de *P. vivax* a partir de sangue humano (ou de

primatas), restringindo estudos para laboratórios localizados em áreas endêmicas (RENAPURKAR *et al.* 1989; NOULIN *et al.* 2013).

A primeira tentativa da cultura *in vitro* de *P. vivax* foi publicado há mais de 100 anos por Bass e Johns (1912), desde então, tem se buscado o aprimoramento da cultura de forma contínua e confiável com algumas condições estabelecidas com sucesso para a cultura de curto prazo em trabalhos (Quadro 2) como:

TASANOR <i>et al.</i> 2002	UDOMSANGPETCH <i>et al.</i> 2007	CHEHUAN <i>et al.</i> 2013
<ul style="list-style-type: none"> • Isolados de campo fase de trofozoita jovem (anel) 	<ul style="list-style-type: none"> • Sangue do cordão umbilical enriquecido em reticulócitos com 3-8% 	<ul style="list-style-type: none"> • Isolados de campo de <i>P. vivax</i>
-	<ul style="list-style-type: none"> • Remoção de leucócitos utilizando coluna CF11 	<ul style="list-style-type: none"> • Lavagem das hemácias com RPMI 1640
<ul style="list-style-type: none"> • Meio de cultura RPMI 1640, Waymouth, L-glutamina, HEPES e bicarbonato de sódio, gentamicina 	<ul style="list-style-type: none"> • Meio de cultura RPMI 1640, L-glutamina, hipoxantina, HEPES e bicarbonato de sódio, gentamicina 	<ul style="list-style-type: none"> • Meio de cultura Waymouth, RPMI 1640, L-glutamina, hipoxantina, HEPES e bicarbonato de sódio, gentamicina
<ul style="list-style-type: none"> • Não houve adição de soro. 	<ul style="list-style-type: none"> • 25% de soro AB humanos 	<ul style="list-style-type: none"> • 30% de soro
<ul style="list-style-type: none"> • Dessecador com vela a 37,5°C 	<ul style="list-style-type: none"> • Cultura foi mantida em incubador de CO₂, com 5% de CO₂, 5% de O₂, e 90% de N₂. 	<ul style="list-style-type: none"> • Incubados a 37°C com a mistura de 5% CO₂, 5% de O₂ e 90% de N₂
<ul style="list-style-type: none"> • Período de incubação de 30 ou 42 horas 	<ul style="list-style-type: none"> • Incubação de 24 horas 	<ul style="list-style-type: none"> • Incubação durante 48h
<ul style="list-style-type: none"> • Determinação por microteste 	<ul style="list-style-type: none"> • Maturação foi determinada por gota espessa. 	<ul style="list-style-type: none"> • Maturação foi determinada por DELI-test e gota espessa
<ul style="list-style-type: none"> • 61,5% apresentaram crescimento de controle adequado 	<ul style="list-style-type: none"> • Parasitos puderam ser cultivados de 10 a 30 dias 	<ul style="list-style-type: none"> • Para a perda de amostras do estudo no que se refere a testes válidos foi estimada em 50%

Quadro 2 - Meios de cultura atualmente utilizados para *P. vivax*.

O melhoramento das condições de cultura a longo prazo tem sido descrito usando células hematopoiéticas como relatado por Furuya *et al.* (2014). Esse método utiliza células hematopoiéticas CD34+ purificadas do sangue do cordão umbilical humano para a produção de reticulócitos. O meio usado foi McCoy 5A enriquecido com

25% de soro AB humano. Foram adicionados parasitos em cultura de células hematopoiéticas e esses últimos foram incubados em 5% de CO₂ a 37°C para permitir a maturação do parasito. Os reticulócitos foram obtidos dentro de 7 a 8 dias em alta porcentagem (15-20%). A utilização destes reticulócitos demonstra que o *P. vivax* pode infectar eficientemente essas células.

Outro método foi relatado por Roobsoong *et al* (2015) que utilizaram amostras clínicas de pacientes com diagnóstico de *P. vivax* na Tailândia ocidental. Os leucócitos foram removidos através do filtro Plasmodipur®. As amostras de sangue infectadas foram cultivadas em meio de McCoy 5A modificado em 5% de hematócrito sob condição de hipóxica (5% O₂, 5% de CO₂, e 90% de N₂). Os reticulócitos purificados a partir de sangue periférico adulto foram adicionados diariamente para manter o nível de 4% reticulócitos. A parasitemia foi avaliada por exame microscópico de esfregaços coradas com Giemsa e métodos moleculares nested-PCR, RT-QMAL. Usando este sistema, 3 dos 30 isolados puderam ser mantidos *in vitro* por um período de cultura mais longa ao longo de 26 meses, embora a densidade de parasito tenha sido baixa.

2.6 Métodos para avaliação da sensibilidade *in vitro* do parasito

Os testes *in vitro* de *Plasmodium* são de grande importância, pois é possível a eliminação de fatores interferentes relacionados ao hospedeiro, tais como sua imunidade e seu metabolismo em relação ao composto, deste modo oferecendo uma avaliação direta do impacto da droga sobre o parasito (CHAIJAROENKUL *et al.* 2005). São basicamente isentos de riscos para o paciente, não são invasivos, além de permitir o crescimento e desenvolvimento do parasito e conseqüentemente sua multiplicação (NOGUEIRA; ROSÁRIO 2010).

2.6.1 Macroteste e microteste

Rieckmann *et al* (1968) desenvolveram o macroteste baseado nas mudanças morfológicas do parasito, onde este passava a se desenvolver da fase de anel jovem para esquizonte. Mais tarde, Rieckmann *et al* (1978) simplificou o procedimento em microcultura para medir a inibição de maturação dos esquizontes em 24 h, que passou a ser conhecida como microtécnica. Essa técnica foi adotada como padrão pela OMS para estudos de campo que servem de monitoramento da resistência *in vitro* de *P. falciparum*

(WHO, 2007). Embora extremamente útil em situações de campo, a microtécnica tem como desvantagens ser bastante laboriosa e exaustiva devido à leitura por microscopia ótica (KYLE *et al.* 2002).

Tradicionalmente, o diagnóstico da doença é feito pela visualização microscópica do *Plasmodium* em esfregaço delgado (distendido) ou espesso (gota espessa) de sangue. Esses métodos possibilitam quantificar a intensidade do parasitismo, mediante a determinação da parasitemia por volume (μl ou mm^3) de sangue. Na prática, o método da gota espessa é o mais utilizado, uma vez que a concentração do sangue por campo microscópico favorece o encontro do parasito. Apesar de a microscopia ser considerada o padrão-ouro para o diagnóstico e monitoramento do tratamento da malária, essa técnica exige pessoal treinado e experiente no exame de distensões sanguíneas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

2.6.2 Incorporação de hipoxantina tritiada

Desjardins *et al* (1979) desenvolveram um ensaio *in vitro* de sensibilidade de droga baseado na incorporação de hipoxantina marcado com trítio pelo parasito para demonstrar o efeito da droga. Este tipo de ensaio permite a utilização de automação que é, portanto, consideravelmente mais rápido para se executar do que os testes com análise microscópica, além de ser mais sensível e objetivo, reduzindo os fatores relacionados à falha humana. É aplicado para o rastreio de compostos candidatos a antimaláricos (NOEDL *et al.* 2003). Contudo apresenta algumas limitações como o manuseio de materiais radiativos; o alto custo do equipamento necessário, como contadores de cintilação líquida (KYLE *et al.* 2002; SANCHEZ *et al.* 2007). Essa metodologia tem sido empregada para avaliar a suscetibilidade de *Plasmodium* as drogas, como no trabalho de Dama *et al.* (2017) que utilizou o ensaio à base de hipoxantina tritiada em estudos conduzidos em Mali para mostrar o aumento na frequência de parasitemia recorrente após tratamento com artemeter-lumefantrina.

2.6.3 Citometria de fluxo

O parasito da malária durante seu estágio sanguíneo digere a hemoglobina presente nos eritrócitos (EGAN, 2008). Quando a hemoglobina é degradada pelo parasito, liberta-se heme e por este composto ser tóxico para o parasito transforma-o em hemozoína. A hemozoína é um cristal birrefringente capaz de desviar um plano de luz

polarizada. Esta propriedade foi utilizada pela primeira vez no diagnóstico de malária por citometria (JACOBBERGER *et al.* 1983; HÄNSCHEID *et al.* 2001). A citometria de fluxo é usada para a identificação de determinadas células em suspensão, permitindo a sua diferenciação quanto ao tamanho, granularidade, intensidade de fluorescência (GRIMBERG *et al.* 2011). O citômetro de fluxo tem sido empregado em testes de sensibilidade em isolados multirresistentes, uma vez que essa técnica fornece quantificação rápida e confiável do crescimento do parasita *ex vivo* (WIRJANATA *et al.* 2015).

Para se quantificar os parasitos da malária têm sido empregado a coloração de parasitos intra-eritrocíticos com a utilização de fluoróforos específicos de DNA, seguidos pela análise por citometria de fluxo permitindo resultados quantitativos, mais rápidos e reprodutíveis (SAITO-ITO *et al.* 2001; JIMENEZ-DIAS *et al.* 2005; KARL *et al.* 2009). O teste de intercalação no DNA com o uso de corantes baseia-se na quantificação automática do crescimento parasitário após sua coloração com corantes fluorescentes que detectam a presença de DNA do parasito em eritrócitos infectados. A tecnologia é baseada em coloração de DNA, como: DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol), Picogreen, YOYO-1 e SYBR Green I (BENNETT *et al.* 2004; JOHNSON *et al.* 2007).

2.6.4 Métodos imunoenzimáticos

Nos últimos anos vários métodos baseados na detecção de antígenos do parasito têm sido desenvolvidos para aprimorar os estudos *in vitro* de resistência e de triagem de novas drogas antimaláricas. Destacam-se entre eles o método imunoenzimático ELISA (*enzyme-linked immunosorbent*). Esse método possui a vantagem em relação ao microteste e ao método com radioisótopos, por não usar material radioativo, são sensíveis, permitem a avaliação de grande número de amostras em tempo relativamente curto. Entre os testes imunoenzimáticos desenvolvidos nos últimos anos, os baseados na detecção da Proteínas-2 Rica em Histidina (HRP2) e da Lactato Desidrogenase (pLDH) do parasito são atualmente os mais promissores (NOEDL *et al.* 2003; TALISUNA *et al.* 2004).

2.6.4.1 Testes baseados em HRP2

O teste de HRP2 é baseado na medição de uma proteína rica em histidina produzido pelo *P. falciparum* no decurso do seu crescimento e multiplicação que tem

meia vida longa, principalmente na fase de trofozoítos. É detectável aproximadamente por duas semanas, é muito estável, e tem maior concentração nos eritrócitos do que no plasma (NOEDL *et al.* 2002). A concentração de HRP2 produzida pelo parasito é medida pelo método de ELISA e serve como indicador para refletir inibição do crescimento na medida de suscetibilidade à droga (DESAKORN *et al.* 1997). Alguns trabalhos tem usado a proteína rica em histidina para analisar amostras como no trabalho de Gibson *et al.* (2017) que empregou ELISA para avaliar as características de eliminação de biomarcadores em amostras de pacientes. O método foi considerado sensível, específico e preciso.

2.6.4.2 Testes baseados em pLDH

A pLDH é produzida por todas as espécies de *Plasmodium* em ambos estágios, sexuais e assexuais. É uma enzima que atua na glicólise anaeróbica e possui um papel importante no metabolismo dos carboidratos necessários para a sobrevivência do parasito (MAKLER *et al.* 1993). O hospedeiro humano possui um análogo, a LDH que está presente no citoplasma de todas as células do organismo e converte de modo reversível, na presença de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD), o piruvato em lactato; a pLDH converte o piruvato através de outra coenzima, a 3-acetil piridina adenina dinucleotídeo (APAD), em L-lactato que resulta em um produto capaz de ser mensurado por espectrofotometria (PIPER *et al.* 1999; NOEDL *et al.* 2003).

As limitações associadas ao teste conduziram ao desenvolvimento de um novo ensaio, também baseado na pLDH. Entretanto, nesse caso, ao invés de determinar a atividade enzimática, o método quantifica a enzima produzida pelo plasmódio através do método de ELISA sanduíche de alta sensibilidade, utilizando dois anticorpos monoclonais (MAbs) específicos para epítomos distintos da mesma enzima. É conhecido como DELI-test (*Double-site enzyme-linked immunodetection*), e é consideravelmente mais sensível que a versão anterior (DRUILHE *et al.* 2001).

Neste ensaio, inicialmente um anticorpo (captura) é adsorvido numa microplaca de poliestileno (Figura 3) formando a fase sólida. Adiciona-se a amostra em teste contendo o antígeno, que neste caso é o pLDH. Essa placa é incubada com um segundo anticorpo (detector) marcado com biotina e, em seguida, adiciona-se a estreptavidina marcada com peroxidase. O substrato cromogênico é adicionado e com a ação da enzima produz cor. Esse teste mostrou ser capaz de detectar parasitemias muito baixas

(0,005%) de *P. falciparum*. (BRASSEUR *et al.* 2000; DRUILHE *et al.* 2001). Uma aplicação desta técnica foi descrita em Chehuan *et al.* (2013) que avaliou suscetibilidade *in vitro* de isolados de campo de *P. vivax* à drogas de tratamento da malária para monitoramento da resistência. A técnica foi efetiva na detecção do crescimento parasitário.

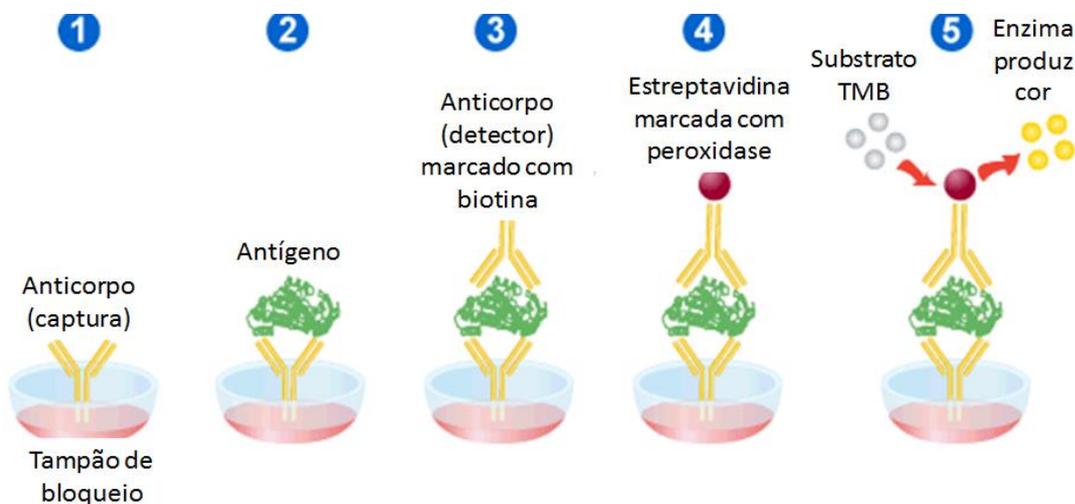


Figura 3 – Etapas do DELI-test.

FONTE: LEICON, 2015.

2.7 Teste de sensibilidade *in vitro* com *P. vivax*

Apesar de ser amplamente distribuída pelo mundo, a malária causada por *P. vivax* continua sendo uma doença negligenciada para a qual poucos estudos de suscetibilidade à droga têm sido realizados. O dogma que classifica a doença como malária benigna é um dos motivos que leva à falta de pesquisas na área, embora haja diversos estudos relatando a gravidade da malária causada por *P. vivax*. Outro motivo é a falta de estabelecimento de um sistema de cultivo contínuo *in vitro* para o *P. vivax* (FLANNERY *et al.* 2013; POHLIT *et al.* 2013).

A rápida disseminação de parasitos da malária resistentes aos antimaláricos, em especial o aparecimento de resistência de *P. vivax* à cloroquina, a escassez de novas classes de drogas antimaláricas mostram grandes desafios para esta espécie. O fato de que este parasito apresenta perfil genético e de sensibilidade diferente do *P. falciparum* tem impulsionado pesquisas com o objetivo de desenvolver novos ensaios. Esses últimos devem ser capazes de mensurar a sensibilidade do *P. vivax* às drogas

tradicionalmente utilizadas e ter utilidade na identificação de novas drogas que comprovadamente ajam nesta espécie de *Plasmodium* (CARLTON *et al.* 2011; GAMA *et al.* 2011).

Alguns trabalhos têm sido feitos com o objetivo de se avaliar a suscetibilidade *in vitro* de isolados de campo de *P. vivax* aos diferentes antimaláricos. A avaliação dos isolados de campo são bons indicativos para se conhecer o estado dos *Plasmodium* atualmente circulantes. Druilhe *et al* (2007) utilizou a técnica do DELI-test para monitoramento da resistência em Myanmar e avaliou a suscetibilidade *in vitro* do *P. vivax* através de um ensaio imunoenzimático com 22 isolados de campo. O ensaio demonstrou sensibilidade para detectar níveis de parasitemia de *P. vivax* muito baixas.

Uma aplicação dessa técnica foi realizado em Manaus, Amazonas por Chehuan *et al* (2013) para avaliar a suscetibilidade *in vitro* de 112 isolados de campo de *P. vivax* à cloroquina e mefloquina. A resistência *in vitro* estimada no estudo foi muito semelhante à observada na clínica, onde 12 isolados foram considerados resistentes à cloroquina e 3 isolados foram resistentes a mefloquina. A técnica do DELI-test mostrou ser efetiva para detectar o crescimento parasitário, contudo apresentou algumas dificuldades com o pequeno número de amostras, a falta de um padrão de corte CI_{50} para a caracterização da resistência em amostras e a falta de comparação do DELI-test com o teste de microscopia.

Outro estudo realizado em Manaus por Pratt-Riccio *et al* (2013) utilizou 88 isolados de *P. falciparum* e 178 isolados de *P. vivax*. A sensibilidade de isolados de *P. falciparum* foi avaliada à cloroquina, quinina, mefloquina e artesunato. Os isolados de *P. vivax* foram testados à cloroquina e mefloquina, utilizando a técnica do DELI-test. Foi observada uma elevada prevalência de isolados de *P. falciparum* resistente à cloroquina (78,1%). No caso do *P. vivax*, a prevalência de isolados com o perfil de resistência à cloroquina foi de 9,8% e a mefloquina de 28%.

Aguiar *et al* (2014) em um estudo conduzido em Rondônia avaliou a suscetibilidade *in vitro* de 47 isolados de *P. vivax* à cloroquina, mefloquina e artesunato. O método utilizado para avaliação da susceptibilidade foi por microscopia ótica e o número de esquizontes em 1000 parasitos assexuados foi determinada para cada concentração de fármaco e depois comparada com o número de esquizontes nos

poços de controle livre de drogas. A resistência à cloroquina foi raramente observada e a maioria dos isolados foram sensíveis à mefloquina e ao artesunato.

A técnica do DELI-test tem sido empregada para a avaliação da suscetibilidade *in vitro* de isolados de campo às drogas tradicionais, além de ser também utilizada para monitoramento da resistência, contudo não há registros de utilização desta técnica em ensaios para se triar novas drogas, sobretudo a partir de produtos naturais.

2.8 Tratamento da malária

Por meio de uma política nacional de tratamento da malária, o Ministério da Saúde, orienta a terapêutica e disponibiliza gratuitamente os medicamentos antimaláricos utilizados em todo o território nacional, em unidades do Sistema Único de Saúde (SUS). O tratamento da doença visa interromper o ciclo evolutivo do parasito em pontos estratégicos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010):

- 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 tardias;
- Interrupção da transmissão do parasito, pelo uso de drogas que impedem o desenvolvimento de formas sexuadas dos parasitos (gametócitos).

O tratamento adequado tanto previne a ocorrência de casos graves e, conseqüentemente, eliminação da malária. Extingue fontes de infecção para os mosquitos, contribuindo para a redução da transmissão da doença (BRASIL/MS/FNS, 2001).

O tratamento primário no Brasil (Quadro 3) para *P. vivax* é composto de duas drogas: a cloroquina (esquizonticida) para eliminar os estágios de parasito assexuada do sangue e primaquina (esquizonticida tecidual) para remover o estágio dormente do parasito (hipnozoítos) responsável pela recaída na infecção por malária (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

Infecções pelo <i>P. vivax</i> ou <i>P. ovale</i> (esquema curto)	
Cloroquina	Primaquina
3 dias	7 dias
comprimido 150 mg	infantil: comprimido 5 mg
	adulto: comprimido 15 mg
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin: 10px auto; width: fit-content;"> <p>OBS.: O esquema curto foi proposto para minimizar a baixa adesão ao tratamento, geralmente ocorrendo com o tempo mais prolongado de uso da droga.</p> </div>	
Infecções pelo <i>P. vivax</i> ou <i>P. ovale</i> (esquema longo)	
Cloroquina	Primaquina
3 dias	14 dias
comprimido 150 mg	infantil: comprimido 5 mg
	adulto: comprimido 15 mg
Infecções pelo <i>P. malarie</i> para todas as idades e <i>P. vivax</i> ou <i>P. ovale</i> em gestantes e crianças < 6 meses	
Cloroquina	
3 dias	
Comprimido de 150 mg	
Prevenção das recaídas frequentes por <i>P. vivax</i> ou <i>P. ovale</i>	
Cloroquina	
12 semanas	
Comprimido de 150 mg	

Quadro 3 - O tratamento para *P. vivax*.

FONTE: MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010.

A maioria dos países com malária por *P. falciparum* adotaram ACTs (terapia de combinação com derivados de artemisinina) como um tratamento de primeira linha (WHO, 2014). A ACT é a utilização simultânea de duas ou mais drogas esquizotomicidas com modos de ação independentes e diferentes alvos bioquímicos do parasito. O conceito de terapia de combinação é baseado no potencial sinérgico ou aditivo de dois ou mais fármacos, para melhorar a eficácia terapêutica e também atrasar o desenvolvimento de resistência aos componentes individuais da combinação. Contudo estes são eficazes em áreas que não há resistência (WHO/CDS/CSR/DRS, 2001).

O uso da artemisinina e os seus derivados (artesanato, artemeter, artemotil, diidroartemisinina) produzem uma rápida resolução da parasitemia com redução do

número de parasitos no sangue (Quadro 4) (WHO, 2006). Isso é devido ao seu tempo de meia vida que elimina o parasito mais rápido. A ação das artemisininas deve ser sempre combinada com um fármaco de meia-vida longa que remova os parasitas restantes, tal como mefloquina, lumefantrina, amodiaquina ou sulfadoxina-pirimetamina (GOLENSER *et al.* 2006).

A malária por *P. vivax* pode ser tratada com ACT em áreas onde a cloroquina ainda é eficaz. E onde a resistência à cloroquina tem sido documentada deve ser tratada com uma ACT apropriada. Em áreas onde há uma ameaça de resistência à artemisinina, os pacientes confirmados com *P. falciparum* devem ser tratados com uma dose única de primaquina no primeiro dia de seu tratamento com ACT (WHO, 2014).

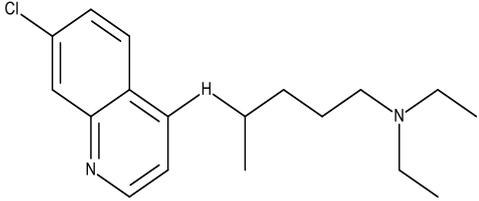
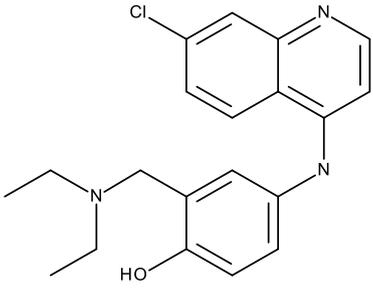
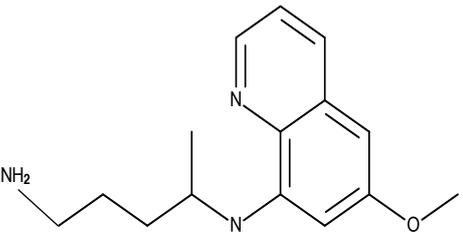
Infecções por <i>P. falciparum</i> com a combinação de artemeter+lumefantrina		
Em 3 dias		
Artemeter	Lumefantrina	Primaquina (dose única)
20 mg	120 mg	15 mg
Infecções por <i>P. falciparum</i> com a combinação de artesunato+mefloquina		
Em 3 dias		
Artemeter	Mefloquina	Primaquina (dose única)
Infantil: 25 mg Adulto: 100 mg	Infantil: 50 mg Adulto: 200 mg	15 mg
Infecções por <i>P. falciparum</i> com a combinação de quinina, doxiciclina e primaquina		
Sulfato de quinina	Doxiciclina	Primaquina
3 dias	5 dias	6° dia
500 mg	100 mg	15 mg
Infecções por <i>P. falciparum</i> não complicadas em gestantes e crianças < 6 meses		
Sulfato de quinina	Clindamicina	
3 dias	5 dias	
500 mg	300 mg	
Infecções mistas por <i>P. falciparum</i> e <i>P. vivax</i> ou <i>P. ovale</i>		
Primaquina infantil: comprimidos de 5 mg		
Primaquina adulto: comprimidos de 15 mg		
OBS.: Se infecção mista com <i>P. malariae</i> , seguir apenas o esquema de <i>P. falciparum</i> .		

Quadro 4 - O tratamento para *P. falciparum*.

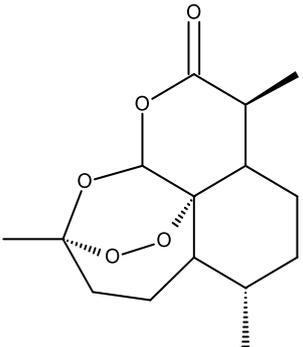
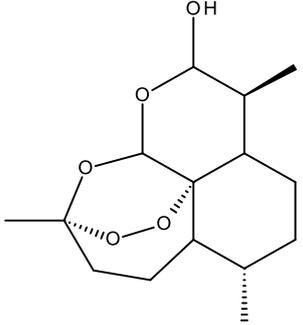
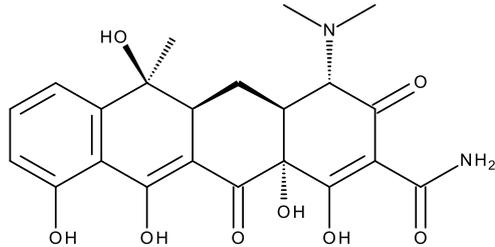
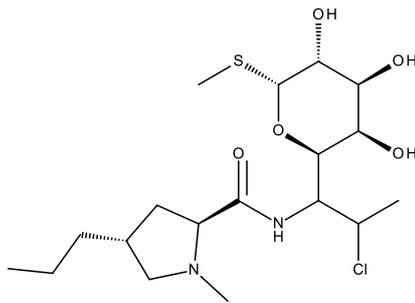
FONTE: MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010.

2.9 Características das drogas antimaláricas

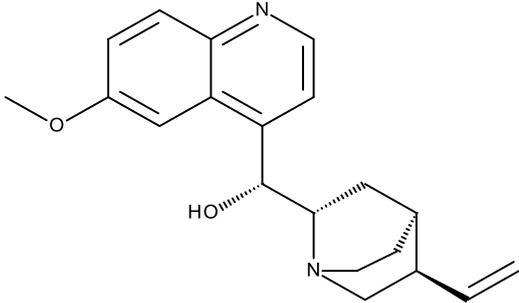
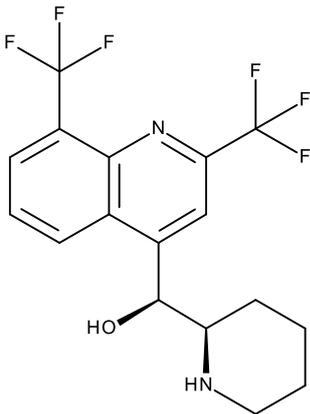
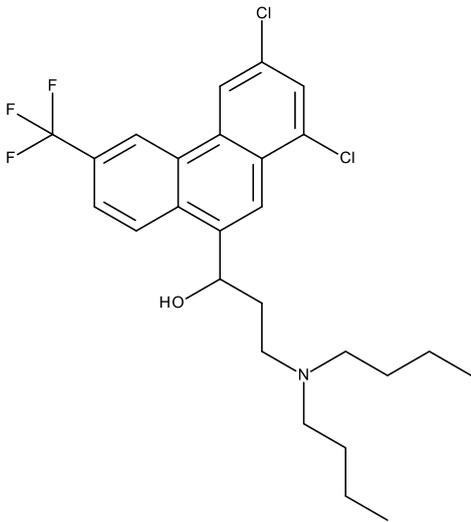
A classificação dos antimaláricos está relacionada com as características químicas, farmacológicas, locais de ação no ciclo biológico do parasito, entre outras. Dentre estas características, dois grandes grupos de drogas têm sido muito utilizados no tratamento da malária: os alcalóides, que são substâncias encontradas em alguns grupos vegetais, em geral nitrogenados, heterocíclicos, com pronunciada ação sobre os animais, e os antifolatos que agem sobre a síntese do DNA. As drogas antimaláricas podem ser classificadas pelo grupo químico e de acordo com o local de ação no ciclo do parasito (Quadro 5) (RANG; DALE, 1993; PAGE *et al.* 1999; BRASIL/MS/FNS, 2001).

Grupo químico	Medicamento	Mecanismo de ação
4-aminoquinolinas	<p>Cloroquina</p>  <p>Amodiaquina</p> 	<p>Envolve a fragmentação do RNA do parasito e é capaz de se intercalar no DNA. Atua por concentrar-se nos lisossomos dos parasitos, inibindo a digestão da hemoglobina, reduzindo o suprimento de aminoácidos necessários para a viabilidade do parasito (THOME <i>et al.</i> 2013).</p>
8-aminoquinolinas	<p>Primaquina</p> 	<p>Agem inibindo a respiração mitocondrial do parasito; são particularmente ativas contra as fases estacionárias (sem crescimento) do parasito (KATZUNG 2006).</p>

Quadro 5 – Classificação das drogas antimaláricas de acordo com o grupo químico e o local de ação no ciclo do parasito.

Grupo químico	Medicamento	Mecanismo de ação
Peróxido de lactona sesquiterpênica	<p data-bbox="507 248 686 280">Artemisinina</p>  <p data-bbox="507 705 750 736">Diidroartemisinina</p> 	<p data-bbox="1094 331 1428 873">Possui uma configuração peróxido (trioxano). Seu mecanismo de ação está relacionado à produção de radicais livres após a clivagem das pontes de endoperóxido da artemisinina catalizada pelo ferro ou através da inibição do Cálcio ATPase do parasita (GOLENSER <i>et al.</i> 2006; WHITE, 2008).</p>
Antibióticos	<p data-bbox="507 1140 662 1171">Tetraciclina</p>  <p data-bbox="507 1541 678 1572">Clindamicina</p> 	<p data-bbox="1094 1182 1428 1635">Possuem uma ação marcante, porém lenta, sobre os estágios eritrocitários da malária. O seu mecanismo de ação possivelmente inibe a síntese proteica ou em outras funções ao nível da mitocôndria ou do apicoplasto (KATZUNG 2006).</p>

Quadro 5 – Classificação das drogas antimaláricas de acordo com o grupo químico e o local de ação no ciclo do parasito (continuação).

Grupo químico	Medicamento	Mecanismo de ação
Arlaminoálcoois	<p>Quinina</p> 	<p>Os metanóis da quinolina e o fenantreno metanol são esquizotomicidas sanguíneos eficazes nos estágios sanguíneos do do parasito da malária envolvidos na digestão da hemoglobina. As duas quinolina-metanóis mais usadas são: quinina e a mefloquina (SCHLESINGER <i>et al.</i> 1988).</p>
	<p>Mefloquina</p> 	
	<p>Halofantrina</p> 	

Quadro 5 – Classificação das drogas antimaláricas de acordo com o grupo químico e o local de ação no ciclo do parasito (continuação).

A quinina que é o alcaloide principal da casca de uma planta medicinal conhecida como *Cinchona officinalis* popularmente conhecida como quina-amarela ou casca peruana. As propriedades dessa planta foram reconhecidas em 1630 na América do Sul (TRACY; WEBSTER, 1996). Em 1633 foi utilizada para tratar febre na Europa. O mecanismo de ação como antimalárico não é bem conhecido, mas sabe-se que inibe a polimerização da hemina tóxica em hemozoína (pigmento malárico). O grupo heme, quando livre, é tóxico para o parasito, e acredita-se que seja inserida no DNA. A droga é uma esquizonticida eficaz de ação contra cepas de *P. falciparum*. O entendimento de sua estrutura química levou ao desenvolvimento de análogos sintéticos como a cloroquina, primaquina, mefloquina, entre outros, no século passado (SCHLESINGER *et al.* 1988; ROCHA, 2009).

A artemisinina é uma substância isolada das folhas de *Artemisia annua*, uma planta medicinal chinesa. A planta começou a ser utilizada para febre em 340 d.C, mas somente em 1798 foi sugerida como tratamento para a malária. Depois que a artemisinina foi isolada como princípio ativo, levou aos derivados semissintéticos como o artesunato de sódio, artemeter, arteether e diidroartemisinina (ANDRADE-NETO *et al.* 2007; ROCHA E SILVA *et al.* 2012b). A artemisinina e seus derivados semissintéticos são os compostos mais efetivos disponíveis para o tratamento de pacientes portadores de cepas multirresistentes de *P. falciparum* (CRUZ *et al.* 2013).

As pressões seletivas das drogas antimaláricas são geralmente classificadas em termos de ação contra os diferentes estágios do ciclo do parasito. As esquizonticidas teciduais ou hipnozoiticidas atuam nas formas exoeritrocíticas no fígado, destruindo os hipnozoítos latentes de *P. vivax* e *P. ovale*. As esquizonticidas sanguíneas atacam os parasitos nas células sanguíneas, prevenindo ou terminando a crise clínica. As gametocitocidas destroem as formas sexuadas do parasito (gametócitos) no sangue, impedindo a transmissão. As esporontocidas interrompem o desenvolvimento da fase esporogônica nos mosquitos que se alimentaram de portadores de gametócitos, de modo que os mosquitos não conseguem transmitir a infecção. Até o momento não existe nenhuma droga desse grupo disponível para uso em humanos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

2.10 Resistência de *Plasmodium* spp. aos antimaláricos

A resistência dos parasitos ao antimalárico é a capacidade que um parasito possui, para sobreviver e se multiplicar apesar da administração de drogas que o combatem em doses terapêuticas sendo estas iguais ou superiores aos normalmente recomendados, mas dentro dos limites de tolerância (WHO, 1973; WERNSDORFER e PAYNE, 1988). Contudo esse conceito sofreu algumas modificações a fim de especificar que o fármaco deve ter acesso ao parasito ou a célula vermelha do sangue infectado durante o período de tempo necessário para a ação normal do fármaco (BRUCE-CHWATT *et al.* 1986; WHO, 1973).

A disseminação da resistência de *Plasmodium* aos fármacos antimaláricos disponíveis nas últimas décadas tem surgido como um dos maiores desafios da luta contra a eliminação da malária. A avaliação da sensibilidade de drogas é de grande importância para o desenvolvimento de diretrizes e políticas terapêuticas (NOEDL *et al.* 2003).

Muitos são os fatores relacionados ao desenvolvimento e distribuição da resistência aos antimaláricos. Um destes fatores é a diversidade nas mutações genéticas dos parasitos que ocorrem naturalmente independentemente do efeito da droga. Outro é a farmacocinética da droga relacionada ao seu longo tempo de meia-vida e eliminação, além das características do hospedeiro, onde os pacientes não imunes estariam mais suscetíveis à resistência (TALISUNA *et al.* 2004). Além desses, também, resistência cruzada entre drogas, tratamentos inadequados, seja por má prescrição, administração ou não adesão ao tratamento (CHIYAKA *et al.* 2009).

2.10.1 Resistência de *P. falciparum*

A OMS estabelece pontos de corte *cut-off* para avaliação de sensibilidade *in vitro* de *P. falciparum* às drogas. Para cloroquina é $CI_{50} < 100$ nM, para quinina é $CI_{50} < 500$ nM e para artemisinina $CI_{50} < 30$ nM. Alguns trabalhos confirmam o limiar de resistência *in vitro* do *P. falciparum* as drogas como Druilhe *et al* (2001).

O Quadro 6 resume os primeiros relatos de resistência no mundo com a espécie de *P. falciparum*. É possível observar que a resistência tem sido relatada com quase todos os fármacos utilizados para o tratamento de malária. Também a potencial resistência a artemisinina e seus derivados já está com várias evidências na literatura.

Também é evidente que a resistência tem ocorrido em um intervalo de tempo cada vez menor.

Fármaco	Introduzido em	Primeiro registro de resistência	Diferença (anos)	Trabalhos dos primeiros registros de resistência
Quinino	1632	1910	278	NEIVA, 1910
Cloroquina	1945	1957	12	YOUNG; MOORE 1961; HARINASUTA <i>et al.</i> 1965
Proguanil	1948	1949	1	PETERS, 1987
Sulfadoxina-Pirimetamina	1967	1967	0	PETERS, 1987
Mefloquina	1977	1982	5	NOSTEN <i>et al.</i> 1991
Artemisinina e derivados	1980	2008	28	NOEDL <i>et al.</i> 2008; DONDORP <i>et al.</i> 2009; AMARATUNGA <i>et al.</i> 2014

Quadro 6 - Primeiros casos registrados da resistência no mundo pelo *P. falciparum* aos antimaláricos.

As ACTs, tratamento de primeira linha para o *P. falciparum*, substituí o tratamento ineficaz com os outros fármacos. Embora as ACTs sejam eficazes para tratamento da malária estão sendo monitorados após a evidência, nos últimos anos, de diminuição da sensibilidade do *P. falciparum* aos derivados de artemisinina (NOEDL *et al.* 2008; DONDORP *et al.* 2009; AMARATUNGA *et al.* 2014).

A diminuição da sensibilidade do *P. falciparum* às drogas habitualmente usadas mostram um sério problema para o controle e erradicação da malária (LEANG *et al.* 2015), pois em todos os países com áreas malarígenas há cepas resistentes de *P. falciparum* à cloroquina e aos demais antimaláricos, além do que há registros de diminuição da sensibilidade do *P. vivax* a estas drogas (GUERIN *et al.* 2002). Alguns genes (*pfprt*, *pfmdr1*, *pfdhfr* e *pfdhps*) estão associados com a diminuição da resposta dos antimaláricos, assim também como associadas à resistência (SOMÉ *et al.* 2014).

2.10.2 Resistência de *P. vivax*

Um dos primeiros achados de resistência do *P. vivax* à cloroquina foi no ano de 1989 em dois soldados australianos que estiveram em Papua Nova Guiné

(RIECKMANN *et al.* 1989). Esses foram seguidos de outros casos na Indonésia (COLLIGNON, 1991; SCHWARTZ *et al.* 1991; SCHUURKAMP *et al.* 1992), Myannar (MYAT *et al.* 1993; MARLAR *et al.* 1995), Índia (GARG *et al.* 1995; VAN DEN ABEELE *et al.* 1995) e em viajantes da Guiana na América do Sul (PHILLIPS *et al.* 1996).

No Brasil, o aparecimento de resistência do *P. vivax* à cloroquina surgiu quase ao mesmo tempo em que a gravidade clínica por esta espécie iniciou. Na Amazônia brasileira a primeira evidência de resistência *in vivo* para cloroquina foi relatada em Manaus. Onde o paciente tratado apresentou resistência à cloroquina e à mefloquina em um mesmo esquema avaliados segundo os critérios de resistência clínica em malária pela OMS (ALECRIM *et al.* 1999).

Na região Amazônica foi relatada recrudescência em pacientes com malária causada por *P. vivax* tratados com cloroquina (SANTANA FILHO *et al.* 2007). E alguns estudos *in vitro* e de dosagens séricas da droga tem confirmado o surgimento de resistência do *P. vivax* na região Amazônica (CHEHUAN *et al.* 2013; MARQUES *et al.* 2014).

A busca para encontrar os marcadores moleculares da resistência aos medicamentos em *P. vivax* foi baseada nos marcadores moleculares determinantes conhecidos em *P. falciparum* (PETERSEN *et al.* 2011). A diminuição da susceptibilidade da cloroquina em *P. vivax* foi associada com a mutação Y976F no gene *pvmdr1*, que é um ortólogo de *pfmdr1* (SUWANARUSK *et al.* 2007; RUSSELL *et al.* 2008; SUWANARUSK *et al.* 2008). E o gene *Pvcrt* em *P. vivax*, um homólogo de *pfcr*, não têm sido associados com resistência à cloroquina, ao contrário em *P. falciparum* em que a mutação no gene mostra um maior grau de resistência (NOMURA *et al.* 2001).

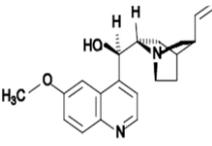
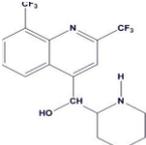
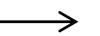
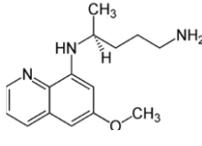
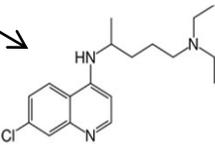
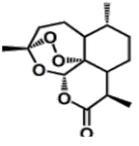
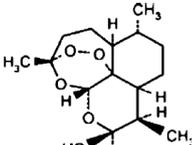
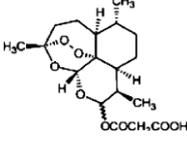
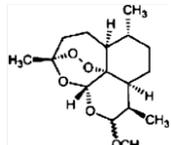
Em trabalhos como de MELO *et al.* (2014) avaliou os níveis dos genes *pvcrt-o* e o *pvmdr-1* em pacientes infectados por *P. vivax* que desenvolveram complicações graves. Onde foi observado que a resistência à cloroquina e gravidade clínica em infecções por *P. vivax* estão associadas com o aumento dos níveis de expressão dos genes *pvcrt-o* e *pvmdr-1*. A resistência a mefloquina em *P. vivax* tem sido associada com a amplificação do gene *pvmdr1*. Além disso, a mutação na posição Y976F do

pvmrd1 in vitro tem sido correlacionada com a resistência à mefloquina, o que requer mais estudos clínicos (SUWANARUSK *et al.* 2008; IMWONG *et al.* 2008).

2.11 Plantas como fonte de novos antimaláricos

A busca por novas drogas para o tratamento da malária surgiu a partir do aparecimento de cepas de *P. falciparum* e *P. vivax* resistentes aos antimaláricos de primeira e segunda linha. Os compostos químicos de origem natural representam uma grande fonte para a descoberta e desenvolvimento de novos medicamentos para doenças, especialmente a malária. A modificação dos produtos naturais através de reações sintéticas e semissíntese pode ser uma ferramenta útil para o desenvolvimento de novas drogas. As reações de semissíntese devem conduzir a derivados com o aumento dos índices terapêuticos, incluindo aumento significativo da atividade farmacológica e/ou diminuição da toxicidade (ROCHA E SILVA *et al.* 2011).

As plantas utilizadas na medicina tradicional como antimaláricos têm fornecido substâncias com comprovada atividade antimalárica (ANDRADE-NETO *et al.* 2007). Como exemplo disso temos a quinina que é o alcaloide principal da casca da *Cinchona calisaya* (Quadro 7) (SCHLESINGER *et al.* 1988; ROCHA, 2009). Outro exemplo importante é a artemisinina que é uma substância isolada das folhas de *Artemisia annua*, uma planta medicinal chinesa (Quadro 7) (ANDRADE-NETO *et al.* 2007; ROCHA E SILVA *et al.* 2012b).

ORIGEM DOS ANTIMALÁRICOS QUINOLÍNICOS	DERIVADOS DA ARTEMISININA
 <p data-bbox="225 734 743 792">Fonte: http://pixshark.com/cinchona-officinalis-tree.htm</p> <p data-bbox="373 842 619 878"><i>Cinchona calisaya</i></p> <div style="display: flex; flex-direction: column; align-items: center;"> <div style="display: flex; align-items: center; margin-bottom: 10px;">  <div style="margin-left: 20px;"> <p data-bbox="280 1395 379 1431">quinina</p> </div> </div> <div style="display: flex; align-items: center; margin-bottom: 10px;">  <div style="margin-left: 20px;">  <p data-bbox="555 1122 703 1158">mefloquina</p> </div> </div> <div style="display: flex; align-items: center; margin-bottom: 10px;">  <div style="margin-left: 20px;">  <p data-bbox="539 1346 687 1382">primaquina</p> </div> </div> <div style="display: flex; align-items: center;">  <div style="margin-left: 20px;">  <p data-bbox="547 1559 687 1594">cloroquina</p> </div> </div> </div>	 <p data-bbox="794 723 1369 781">Fonte: http://www.infonet-biovision.org/PlantHealth/MedicinalPlants/Artemisia</p> <p data-bbox="970 842 1187 878"><i>Artemisia annua</i></p> <div style="display: flex; flex-direction: column; align-items: center;"> <div style="display: flex; align-items: center; margin-bottom: 10px;">  <div style="margin-left: 20px;"> <p data-bbox="818 1346 975 1382">artemisinina</p> </div> </div> <div style="display: flex; align-items: center; margin-bottom: 10px;">  <div style="margin-left: 20px;">  <p data-bbox="1066 1122 1302 1158">diidroartemisinina</p> </div> </div> <div style="display: flex; align-items: center; margin-bottom: 10px;">  <div style="margin-left: 20px;">  <p data-bbox="1137 1346 1270 1382">artesunato</p> </div> </div> <div style="display: flex; align-items: center;">  <div style="margin-left: 20px;">  <p data-bbox="1137 1559 1262 1594">artemeter</p> </div> </div> </div>

Quadro 7- Origem dos antimaláricos quinolínicos e derivados da artemisinina.

2.12 Plantas Antimaláricas Amazônicas

Segundo a OMS 80% da população do planeta, utilizam plantas medicinais como medicamentos. Apenas 8% dessas plantas são sistematicamente estudadas em termos de compostos bioativos. A flora brasileira, em especial a floresta Amazônica, é

uma larga e inexplorada fonte de moléculas com potencial farmacológico. Várias plantas da região são utilizadas popularmente para o tratamento da malária. *Piper peltatum* (caapeba), *Aspidosperma* spp. e *Picrolema* spp., são algumas espécies utilizadas sob a forma de chás pelos indígenas e ribeirinhos para o tratamento da doença na região (PINTO *et al.* 2009; HENRIQUE *et al.* 2010; SILVA *et al.* 2011).

A elipticina, alcaloide indólico, (Figura 4) (Quadro 8) isolada a partir do extrato etanólico da casca de *Aspidosperma vargasii* (Apocynaceae) árvore da Amazônia usada na medicina tradicional como um antimalárico (ANDRADE-NETO *et al.* 2007; HENRIQUE *et al.* 2010). Andrade-Neto *et al.* (2007) avaliou a suscetibilidade *in vitro* do alcalóide que apresentou um índice inibitório mais ativo do que o quinino e cloroquina. Recentemente, elipticina teve sua atividade *in vitro* e *in vivo* confirmada com inibição de 100% do crescimento em camundongos infectados por *P. berghei* e apresentou atividade frente a cepa K1 (cloroquino-resistente) CI_{50} (concentração que inibe 50% do parasito) de 0,81 μM (ROCHA E SILVA *et al.* 2012a). Em outro trabalho um análogo estrutural e derivados da elipticina exibiram boa inibição *in vitro* de cepas K1 e 3D7 de *P. Falciparum*. O CI_{50} da elipticina com a cepa K1 foi de 0,81 μM e com 3D7 de 0,35 μM (MONTIOIA *et al.* 2014).

O 4-nerolidilcatecol, terpeno fenil propanóide, (Figura 4) (Quadro 8) é um metabólito isolado a partir das raízes de *Piper peltatum* (Piperaceae). A planta é amplamente utilizada na região Amazônica por suas propriedades medicinais antiinflamatória e antimalárica (PINTO *et al.* 2009). Este composto já foi estudado *in vitro* frente à cepa K1 e 3D7 de *P. falciparum*, além de isolados de campo da região Amazônica, onde apresentou ótima atividade com CI_{50} abaixo do valor de 1 μM , que dentro dos padrões de atividade seria ativo. E moderada atividade *in vivo* contra *P. berghei* (ANDRADE-NETO *et al.* 2007; ROCHA E SILVA *et al.* 2011). Contudo a substância é degradável e quimicamente instável. Para melhorar suas propriedades Pinto *et al.* (2009) prepararam a partir do 4-nerolidilcatecol derivados semissintéticos alguns dos quais demonstraram atividade antiplasmódica comparável ao produto natural original (ANDRADE-NETO *et al.* 2007; PINTO *et al.* 2009). Dentre estes, o derivado 4-nerolidilcatecol diacetilado (Figura 4) apresentou atividade antimalárica *in vitro* superior ao produto natural e *in vivo* exibiu melhoria acentuada com supressão do crescimento de *P. berghei* em 44% com 50mg (ROCHA E SILVA *et al.* 2015).

A partir de infusões dos caules de *Picrolemma sprucei* (Simaroubaceae) foram isolados os quassinoides isobruceína B (KUPCHAN *et al.* 1975) (Figura 4) e neosergeolida (ZUKERMAN-SCHPECTOR *et al.* 1994) (Figura 4) (Quadro 8). Essas substâncias são metabolitos secundários bioativos que pertencem à classe dos terpenóides altamente oxigenados conhecidos como quassinóides, uma classe que é encontrada exclusivamente na família de plantas Simaroubaceae (POHLIT *et al.* 2009; SILVA *et al.* 2009). A *P. sprucei* é uma das várias espécies de plantas conhecidas na Amazônia brasileira como "caferana" (SILVA *et al.* 1977). Em estudos de Silva *et al.* (2009) foram identificados um potencial biológico, em menor medida dos seus derivados semissintéticos para a sua atividade *in vitro* antimalárica e citotóxicas. Onde a isobruceína B apresentou CI_{50} de 0,002 μ M com a cepa K1 e neosergeolida com CI_{50} de 0,01 μ M com a cepa K1.

Carapa guianensis é outra planta utilizada para tratamento da malária por praticantes de medicina tradicional na região Amazônica. No trabalho de Pereira *et al.* (2014) foi avaliada a atividade *in vitro*, *in vivo* e citotoxicidade de limonoides isolados do material residual de semente prensado (RPSM) de *C. guianensis*. A 6 α -acetoxigedunina (Figura 4) (Quadro 8) é um produto natural abundantes presente nos materiais residuais da sementes de *C. guianensis* que exhibe significativa propriedades antimaláricas *in vitro* com CI_{50} de 7,0 μ M (cepa K1) e *in vivo* com administração via oral de 100mg/Kg suprimiu 66% do *P. berghei*. E o limonoide 6 α -hidroxi-deacetilgedunina (Figura 3) foi obtido por semi-síntese a partir do 6 α -acetoxigedunina e exibiu significativa atividade *in vitro* frente ao *P. falciparum* com CI_{50} de 5,0 μ M (cepa K1).

Lima *et al.* (2015) avaliou a atividade *in vitro* da cepa K1 e W2 de *P. falciparum* frente a 69 extratos de onze espécies de plantas preparados a partir de extração contínua pelo aparelho Soxhlet. A alta atividade antimalárica foi observada em dois extratos brutos a partir da *Andropogon leucostachyus* (metanol) e *Xylopiã amazônica* (etanol e clorofórmio) mostraram boa atividade *in vitro* contra cepas de *P. falciparum* com CI_{50} de 7.1 ± 3.3 μ g/mL e 7.3 ± 1.8 μ g/mL respectivamente. Também foi avaliada a citotoxicidade contra linhas de células normais e tumorais. A maior atividade *in vivo* foi do extrato vegetal da *A. leucostachyus* que inibiu *P. berghei* em 71% em comparação com controles.

Espécie	Família	Nome popular	Princípios Químicos	Resultado	Fonte
 <i>Aspidosperma vargasii</i>	Apocinaceae	Peroba/ carapaná	Elipticina, aspidocarpina	- CI ₅₀ de 0,81 µM com a cepa K1 (<i>Pf</i>) - 50mg/Kg VO Supressão de 100% do <i>P. berghei</i> ROCHA-E-SILVA <i>et al.</i> 2012	(ANDRADE-NETO <i>et al.</i> 2007; HENRIQUE <i>et al.</i> 2010; POHLIT <i>et al.</i> 2012; MONTOIA <i>et al.</i> 2014)
 <i>Piper peltatum L</i>	Piperaceae	caapeba	4-nerolidilcatecol	- CI ₅₀ de 0,60 µg/mL com a cepa K1(<i>Pf</i>) - 600mg/kg VO e SB Supressão de 63% do <i>P. berghei</i> ROCHA-E-SILVA <i>et al.</i> 2011	(ANDRADE-NETO <i>et al.</i> 2007; PINTO <i>et al.</i> 2010; PINTO <i>et al.</i> 2009;
			4-nerolidilcatecol diacetilado (Derivado semissintético)	- CI ₅₀ de 4,85 µM com a cepa K1 (<i>Pf</i>) - 50mg VO Supressão de 44% do <i>P. berghei</i> ROCHA-E-SILVA <i>et al.</i> 2015	ROCHA-E-SILVA <i>et al.</i> 2011; ROCHA-E-SILVA <i>et al.</i> 2015)
 <i>Picrolemma Sprucei</i>	Simaroubaceae	caferana	Isobruceína B Neosergeolida	- CI ₅₀ 0,002 µM com a cepa K1 (<i>Pf</i>) - CI ₅₀ 0,01 µM com a cepa K1 (<i>Pf</i>)	(KUPCHAN <i>et al.</i> 1975; ZUKERMAN-SCHPECTOR <i>et al.</i> 1994; POHLIT <i>et al.</i> 2009; SILVA <i>et al.</i> 2009)
 <i>Carapa guianensis</i>	Meliaceae	andiroba	Limonóides Gedunínicos 6α-acetoxigedunina 6α-hidroxi-deacetilgedunina	- CI ₅₀ de 7,0 µM com a cepa K1 (<i>Pf</i>) - 100mg/Kg VO Supressão de 66% do <i>P. berghei</i> - CI ₅₀ de 5,0 µM	(PEREIRA <i>et al.</i> 2014)

Quadro 8 - Principais plantas amazônicas investigadas para atividade antimalárica pelo grupo de pesquisas em Manaus.

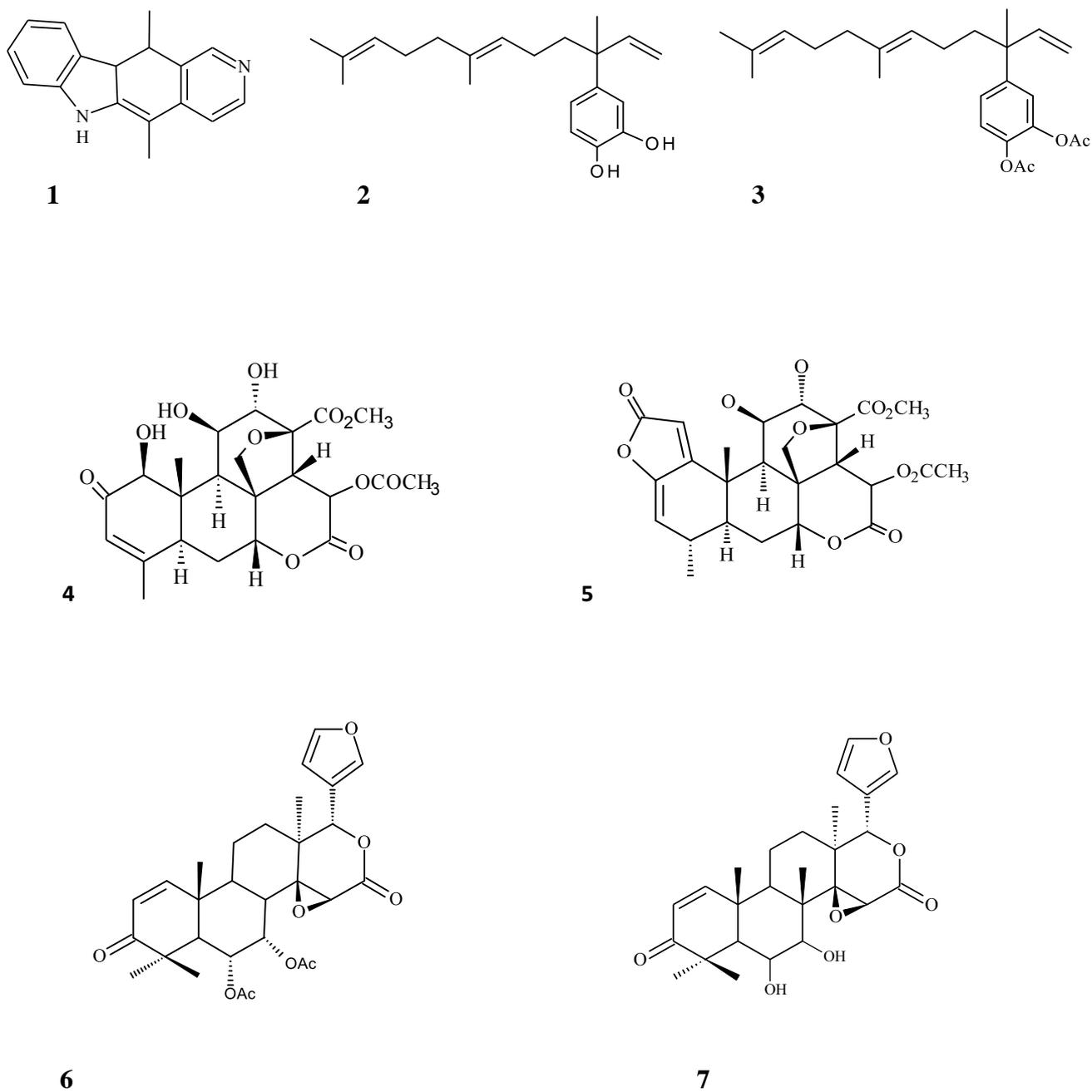


Figura 4 – Estruturas das substâncias elipticina (1), 4-Nerolidilcatecol (2), 4-Nerolidilcatecol diacetilado (3), Isobruceína B (4), Neosergeolida (5), 6 α -acetoxigedunina (6) e 6 α -hidroxi-deacetilgedunina (7).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

- ✓ Avaliar a susceptibilidade *in vitro* de isolados de campo de *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium vivax* a substâncias e extratos obtidos de plantas amazônicas

3.2 Específicos

- ✓ Contribuir para o aperfeiçoamento de protocolo de teste *in vitro* com isolados de campo de *P. vivax*;
- ✓ Avaliar a susceptibilidade *in vitro* de isolados de campo de *P. falciparum* e *P. vivax* às substâncias e aos extratos de plantas amazônicas pelo método do DELI-test e por microscopia.
- ✓ Comparar as concentrações inibitórias obtidas *in vitro* das substâncias e extratos de plantas com isolados de campo de *P. vivax*, *P. falciparum* e cepas padrão K1 e 3D7 de *P. falciparum*.

4 METODOLOGIA

O presente estudo possuiu etapas que estão descritas no fluxograma a seguir:

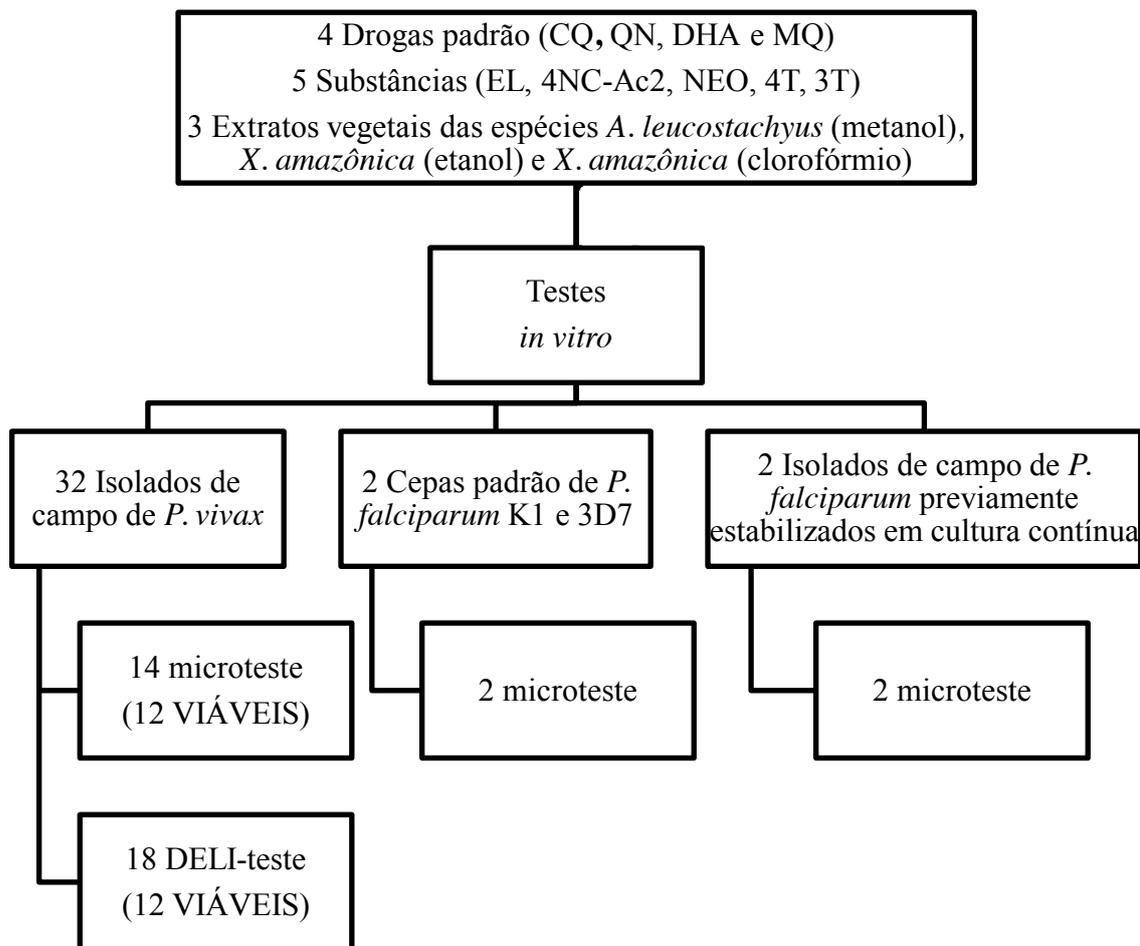


Figura 5 – Fluxograma dos procedimentos do presente trabalho

Legenda: EL – elipticina, 4NC-Ac2 – 4-nerolidilcatecol diacetilado, NEO – neosergeolida, 4T – 6 α -acetoxygedunina, 3T – 6 α -hidroxi- deacetilgedunina, AL – *A. leucostachyus*, XA – *X. amazônica*, CQ – cloroquina, QN – quinina, DHA – diidroartemisinina, MQ – mefloquina.

4.1 Local de estudo

O estudo foi realizado mediante parceria interdisciplinar e interinstitucional entre o Laboratório de Princípios Ativos da Amazônia (LAPAAM) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) e a Gerência de Malária da Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) considerado centro de referência nacional e internacional para o tratamento de enfermidades tropicais e possui importante participação no diagnóstico e tratamento da malária.

A coleta de amostras de sangue parasitado com *P. vivax* ocorreu entre março e outubro de 2015 na Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado na cidade de Manaus, Estado do Amazonas.

4.2 Amostra de *Plasmodium*

Para o estudo foram utilizadas cepas padrão de *P. falciparum*, isolados de campo de *P. falciparum* e isolados de campo de *P. vivax* obtidos conforme descrito a seguir:

4.2.1 Cepas padrão de *P. falciparum*

As cepas padrão de *P. falciparum* utilizadas foram a K1 e 3D7 obtidas após cadastramento da Gerência de Malária no Malaria Research and Reference Reagent Resource Center (MR4), Manassas Virginia, Estados Unidos, caracterizadas quanto a sua susceptibilidade a várias drogas (Tabela 1).

Cepa	Código	Fenótipo	
		Sensível	Resistente
K1	MRA-159,	mefloquina	cloroquina
	MR4, ATCC	quinina	pirimetamina cicloguanil
3D7	MRA-102,	cloroquina	
	MR4, ATCC	mefloquina quinina	

Tabela 1: Cepas Padrão de *P. falciparum*

4.2.2 Isolados de campo de *P. falciparum*

No presente estudo foram utilizados dois isolados de campo de *P. falciparum* (A.L. e M.R.V.) integrantes do criobanco mantido em cultivo *in vitro*, criopreservado e congelados no Laboratório da Gerência de Malária da FMT-HVD.

As amostras de sangue infectado são do município de Manaus, e foram obtidas por punção venosa de pacientes da demanda passiva da FMT-HVD, após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, em um estudo anterior realizado durante o mestrado de ROCHA, 2009 coordenado pelo Dr. Pedro Paulo Ribeiro Vieira.

Os isolados foram estabilizados em cultivo contínuo conforme descrito por ROCHA E SILVA *et al* 2012b.

4.2.3 Isolados de campo de *P. vivax*

Os testes *in vitro* com cultura limitada com os isolados de campo de *P. vivax* foram realizados no Laboratório de Cultura FMT-HVD em colaboração com a Gerência de Malária. Foram coletadas 32 amostras de sangue de pacientes mono infectados com *P. vivax* oriundos da rotina de diagnóstico de malária na FMT-HVD. E obtido um volume de 5 mL de sangue venoso através da coleta por punção venosa do antebraço do paciente com malária utilizando tubos Vacutainer (Becton Dickinson ®, Oxnard, CA) com anticoagulante.

O estudo foi conduzido com pacientes que tiveram confirmado o diagnóstico de malária por gota espessa corada pelo método descrito por Walker (OPS/OMS, 1975) - através da contagem do número de parasitos em 200 leucócitos, que permite inferir o número de parasitos/ μ L de sangue. Foram incluídos os pacientes mono infectados com *P. vivax* com parasitemia igual ou superior a 1000 parasitos assexuados/ μ L de sangue, idade igual ou maior que 18 anos, de ambos os sexos, residentes nas zonas rural e urbana do município, independente do número de vezes que tiveram malária.

Foram excluídos pacientes menores de 18 anos, sem quadro clínico de malária grave e complicada, sem uso de antimaláricos nos últimos 30 dias, e aqueles que apresentaram resultado positivo para malária mista.

4.3 A aprovação ética

As amostras foram obtidas de pacientes com *P. vivax* que, após entrevista individual, aceitaram participar. Todos os participantes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido – TCLE (ANEXO 1) dentro dos preceitos da ética em pesquisa com humanos, informado antes da coleta de sangue com intuito de justificar a pesquisa bem como prestar informações do objetivo do trabalho e esclarecer o procedimento a ser utilizado, as precauções e a privacidade dos participantes. Sem prejuízo para o seu atendimento ou seu tratamento.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) com parecer número 339.265 (ANEXO 2).

4.4 Obtenção das substâncias químicas e extratos vegetais

A realização do estudo fitoquímico (extração, fracionamento e purificação de metabólitos secundários a partir de plantas), incluindo a semissíntese de substâncias foi realizado pela equipe de pesquisadores-bolsistas e alunos de pós-graduação orientados pelo Dr. Adrian Pohlit no LAPAAM, de onde foram obtidos as substâncias e extratos para a avaliação *in vitro*.

As espécies de vegetais utilizadas neste estudo possuem indicação popular para o tratamento da malária de acordo com fontes da literatura científica. Foram escolhidas plantas cujo estudo fitoquímico estava em andamento no LAPAAM e que já haviam sido descritas apresentando atividade antimalárica *in vitro* em trabalhos já publicados.

Para estes ensaios de avaliação da susceptibilidade *in vitro* dos isolados de campo de *P. vivax* e dos isolados de campo *P. falciparum* previamente estabilizados foram selecionadas cinco substâncias e dois extratos ativos *in vitro* frente a cepas de *P. falciparum* e representativas de diferentes classes de produtos naturais, conforme abaixo.

4.4.1 Obtenção do alcaloide indólico elipticina

O alcaloide elipticina foi isolado da casca de *Aspidosperma vargasii* coletada na Reserva Florestal Adolpho Ducke em Manaus, Amazonas e cedida pela Doutoranda Andréia Montóia durante sua dissertação de mestrado no PPGQ/UFAM (2013) com as cepas K1 e 3D7 de *P. falciparum*. O método de isolamento está descrito em Montoia *et al* (2014).

4.4.2 Obtenção do derivado fenilpropanoide *O,O*-diacetil-4-nerolidilcatecol

A obtenção do 4-nerolidilcatecol e a produção de seu derivado *O,O*-diacetil-4-nerolidilcatecol (4-nerolidilcatecol diacetilado) foi realizado em colaboração com a Dra.

Ana Cristina da Silva Pinto, pesquisadora-bolsista do INPA. O 4-nerolidilcatecol foi obtido a partir das raízes de *Piper peltatum* secas e pulverizadas. O derivado *O,O*-diacetil-4-nerolidilcatecol foi preparado a partir de 4-nerolidilcatecol pela adição de anidrido acético (Ac_2O) e piridina ($\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$). *O,O*-diacetil-4-nerolidilcatecol foi previamente testado contra as cepas K1 e 3D7 de *P. falciparum*. O método de isolamento está descrito em Pinto *et al* (2009).

4.4.3 Obtenção do quassinóide neosergeolida

A substância neosergeolida utilizada no estudo foi isolada das raízes e caules de *Picrolemma sprucei* o estudo fitoquímico foi realizado pelo Dr. Rodrigo Cesar das Neves Amorim, pesquisador-bolsista durante sua tese de doutorado no PPGBIOTEC/UFAM (2009) testados com as cepas (K1) de *P. falciparum*. O método de isolamento está descrito em Silva *et al* (2009).

4.4.4 Obtenção dos limonoides 6 α -acetoxigedunina e seu derivado 6 α -hidroxideacetilgedunina

O limonoide 6 α -acetoxigedunina foi isolado do resíduo das sementes de *Carapa guiananensis* após expressão do óleo fixo e o limonoide 6 α -hidroxideacetilgedunina foi obtido por semissíntese a partir de 6 α -acetoxigedunina. O isolamento e a semissíntese dos limonoides foi realizada pelo Doutorando Tiago Pereira durante sua dissertação de mestrado no PPGQ/UFAM (2013). As substâncias foram previamente testados contra a cepa K1 de *P. falciparum*. O método de isolamento está descrito em Pereira *et al* (2014).

4.4.5 Obtenção dos extratos vegetais a partir da *Andropogon leucostachyus* e *Xylopia amazônica*

O estudo biológico dos extratos brutos das espécies de *A. leucostachyus* e *X. amazônica* foi realizado pela Dra. Renata Braga durante sua tese de doutorado no PPGQ/UFAM (2015). Foram testados contra as cepas K1 e W2 de *P. falciparum* e exibiram boa atividade *in vitro*. O método de isolamento está descrito em Lima *et al* (2015).

4.5 Obtenção das drogas padrão

Para avaliação da susceptibilidade *in vitro* das cepas padrão, isolados de campo de *P. falciparum* e *P. vivax* foi avaliada utilizando as drogas padrões difosfato de cloroquina, diidroartemisinina, cloridrato de quinina e cloridrato de mefloquina adquiridos comercialmente da Sigma-Aldrich®.

4.6 Preparação das soluções estoques

4.6.1 Preparação das soluções estoques dos produtos naturais

As substâncias elipticina, 4-nerolidilcatecol diacetilado, neosergeolida, 6 α -acetoxygedunina, 6 α -hidroxi-deacetilgedunina e os extratos *A. leucostachyus*, *X. amazônica* foram preparados na concentração estoque de 10 mg/mL solubilizadas em dimetilsulfóxido (DMSO) e submetidos ao banho de ultra-som por 10 minutos.

As soluções-mãe eram utilizadas por um período máximo de uma semana para preparo das soluções de uso (soluções-filha). As soluções-filhas foram preparadas a partir das soluções-mãe e diluídas em meio RPMI 1640, sendo utilizadas apenas no dia da preparação. A cada dia era preparada uma solução fresca. Para o preparo das soluções-filhas, utilizou-se o meio específico para o *P. vivax* ou para *P. falciparum*.

4.6.2 Preparação das soluções estoques das drogas padrões

Foram preparadas soluções-mãe estoque das drogas padrão para cada placa teste na concentração de 10 mg/mL. Conforme WHO, 2007 o difosfato de cloroquina foi dissolvida diretamente em meio de cultura RPMI 1640, diidroartemisinina, cloridrato de quinina e cloridrato de mefloquina foram dissolvidas em etanol 70%. Essas drogas foram submetidas ao banho de ultra-som por 10 minutos. A partir destas soluções-mãe foram preparadas as soluções-filhas.

4.7 Diluições das drogas, substâncias químicas e extratos para obtenção das concentrações testes

A partir das soluções-filhas preparou-se a placa com as diluições seriadas de cada droga. Onde foram realizadas séries de diluições para obtenção das concentrações finais de teste.

As soluções-filhas foram diluídas em meio de cultura de modo a obter sete concentrações testes para cada amostra dentro de suas faixas de concentração (Tabela 2). Cada concentração foi testada em duplicata em uma microplaca contendo poços controles livre de droga com apenas a suspensão de hemácias parasitadas e poços controles contendo o solubilizante DMSO à 1%.

CONCENTRAÇÕES $\mu\text{g/mL}$			CONCENTRAÇÕES ng/mL	
Substâncias	Extratos		Drogas padrão	
EL, 4NC-Ac2, 4T, 3T	NEO	AL, XA	CQ, QN	DHA, MQ
100	10	100	1000	100
20	2	50	333,3	33,33
4	0,4	25	111,1	11,11
0,8	0,08	12,5	37,0	3,70
0,16	0,016	6,25	12,3	1,23
0,032	0,0032	3,12	4,1	0,41
0,006	0,0006	1,56	1,4	0,14

Tabela 2 – Valores das sete diferentes concentrações dos produtos naturais e drogas padrão.

Legenda: EL – elipticina, 4NC-Ac2 – 4-nerolidilcatecol diacetilado, 4T – 6 α -acetoxypedunina, 3T – 6 α -hidroxi- deacetilgedunina, NEO – neosergeolida, AL – *A. leucostachyus*, XA – *X. amazônica*, CQ – cloroquina, QN – quinina, DHA – diidroartemisinina, MQ – mefloquina.

4.8 Cultivo *in vitro* do *P. falciparum* e microteste de susceptibilidade *in vitro*

As cepas padrão de *P. falciparum* K1 e 3D7 e os dois isolados de campo utilizadas neste estudo eram integrantes do criobanco mantido no Laboratório da Gerência de Malária da FMT-HVD.

4.8.1 Descongelamento das cepas padrão e dos isolados de campo

O descongelamento foi realizado para as cepas padrão K1 e 3D7 e os dois isolados de campo de *P. falciparum*. O procedimento foi o mesmo para todos, onde

inicialmente os tubos contendo hemácias parasitadas foram retirados do nitrogênio líquido e deixados à temperatura ambiente até o descongelamento completo. Este conteúdo dos tubos foi transferido para tubos cônicos de 15 mL e adicionaram-se lentamente várias concentrações de uma solução salina de cloreto de sódio (NaCl), seguida da centrifugação a 2.500 rpm por 10 minutos o que resultou num *pellet* de hemácias ressuspenso em 5 mL de meio de cultura RPMI 1640 enriquecido com plasma A⁺. Depois foram adicionados 500 µL de uma suspensão de hemácias não parasitadas preparados a 50%.

4.8.2 Manutenção da cultura de *P. falciparum*

A metodologia de cultivo *in vitro* de *P. falciparum* utilizada foi uma modificação da técnica de Trager e Jensen (1976) adaptada pelo laboratório de malária da FMT-HVD e baseia-se no desenvolvimento laboratorial dos estágios eritrocitários desta espécie parasitária.

Após o descongelamento das amostras, os parasitos foram mantidos a 37°C em frascos de poliestireno (40 mL) hermeticamente fechados. A troca do meio foi realizada diariamente, sendo a retirada desse meio efetuada por sucção a vácuo com o auxílio de uma pipeta Pasteur estéril. Todo o procedimento de descongelamento e manutenção das culturas foi feito em ambiente de total assepsia (câmara de fluxo laminar).

Foi realizada a troca do meio com 4,5 mL de solução composta por meio específico para *P. falciparum* com RPMI 1640 suplementado com NaHCO₃ (32 mM), HEPES (25 mM), hipoxantina (37 mM), glutamina (2 mM), glicose (10 mM), 0,4 mL de gentamicina e 10% de plasma humano tipo A⁺ inativado a 56°C. E para os isolados de *P. falciparum* foi preparado o meio RPMI 1640 contendo HEPES (25 mM), NaHCO₃ (25 mM), hipoxantina (10 µg/L), gentamicina 20 µL e Albumax (Gibco®) à 10%.

Além da troca do meio foi adicionada suspensão de hemácias não parasitada preparada a 50%, sempre que necessário, para obtenção de 500 µL de sangue parasitado (suspensão de eritrócitos tipo A⁺ com hematócrito em torno de 5%). A adição de suspensão de hemácias não parasitadas foi feita em períodos de 48 horas, e sempre que a cultura apresentou predomínio de esquizontes e/ou parasitemia maior do que 2%. Após esta etapa foi adicionada uma mistura de gases para manter uma micro-atmosfera de baixa tensão de oxigênio (5% de O₂, 5% de CO₂ e N₂ balanceado).

O acompanhamento do crescimento parasitário foi feito a cada 24h durante o procedimento de troca do meio. A contagem parasitária foi realizada pela observação de esfregaços sanguíneos corados pelo método panótico® (Laborclin, Brasil). A parasitemia foi calculada na forma de percentual de formas eritrocíticas viáveis observadas durante a contagem de 2000 hemácias.

4.8.3 Microteste de susceptibilidade *in vitro*

4.8.3.1 Método por análise microscópica

O microteste foi realizado segundo metodologia descrita por Rieckmann *et al* (1978), com modificações descritas por Andrade-Neto *et al* (2007). Foi aplicado para os testes *in vitro* com cepas e os isolados de campo de *P. falciparum* e isolados de campo de *P. vivax*.

A partir das soluções-filha, 20 µL de sete diluições das amostras foram aplicados em uma microplaca em duplicata de modo a obter as concentrações finais descrito na Tabela 2. Posteriormente aplicados 180 µL de suspensão de hemácias parasitadas obtendo o volume final de 200µL por poço. Poços contendo somente hemácias parasitadas suspensas em meio de cultura completo representaram o controle de crescimento, além dos poços contendo DMSO a 1%. A placa foi incubada por 48 horas em estufa de CO₂ à 37°C.

Ao fim do período de incubação foram confeccionados esfregaços sanguíneos a partir do sedimento de hemácias retiradas de cada poço. Os esfregaços foram corados pelo Panótico® e examinados no microscópio óptico, onde se contou a quantidade de parasitos presentes num total de 2.000 hemácias.

A parasitemia foi expressa em porcentagem, calculada a partir do número de hemácias parasitadas no total de hemácias contadas, segundo a fórmula abaixo:

$$\text{Parasitemia em \%} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ hemácias parasitadas} \times 100}{\text{N}^{\circ} \text{ total de hemácias}}$$

4.8.3.2 Análise dos dados

As parasitemias resultantes das análises microscópicas do conteúdo dos poços testes foram comparadas com as parasitemias dos poços controles para se avaliar a viabilidade de crescimento do parasito frente a cada concentração de amostra, calculada a partir da razão entre a parasitemia dos poços testes e a parasitemia dos poços controle. A concentração inibitória 50% (CI₅₀) das drogas, substâncias e extratos para cepas e isolados de campo de *P. falciparum* foi calculada com auxílio do software Microcal Origin 8.1® (OriginLab).

4.9 Teste *in vitro* com isolados de campo de *P. vivax*

Foram obtidos 32 amostras de *P. vivax* de pacientes da FMT-HVD, dos quais 14 foram testados por microteste e 18 pelo DELI-test. Após a coleta o sangue colhido passou por um processo de centrifugação (2000 rpm a 10 min, temperatura ambiente) para a retirada do plasma e as hemácias foram lavadas com uma solução de meio estoque contendo RPMI-1640 (Gibco BRL, Paisley, Reino Unido), hepes (Sigma) e bicarbonato de sódio (Sigma).

Para retirada de leucócitos foram empregado o método CF11 descrito por Sriprawat *et al* (2009) com algumas modificações. Uma seringa de 10 mL (com o êmbolo removido) foi revestida internamente com lã de vidro de modo a cobrir o lúmen de saída. A seringa foi acoplada a um tubo cônico de 15 mL. Posteriormente foi adicionada à seringa celulose em pó CF11 (Whatman®) até o nível de 4mL onde inicialmente foi filtrado o meio RPMI 1640 e posterior a suspensão de hemácias lavadas. O filtrado foi recolhido num tubo cônico, depois centrifugado e retirado o sobrenadante resultando apenas no *pellet* de hemácias.

4.9.1 Meios de cultura para *P. vivax*

Foi realizada a padronização da técnica de cultivo limitado de *P. vivax* por meio de levantamento de dados baseado em trabalhos que desenvolveram o cultivo *in vitro* com isolados de *P. vivax*. Druilhe *et al* (2007) utilizaram meio de cultura contendo meio RPMI 1640, hepes (25 mM), NaHCO₃ (25 mM), hipoxantina (10 ug/L) e meio Waymouth (Flow Laboratories, Irvine, Reino Unido) suplementado com 12% de soro

humano AB⁻. Russell *et al* (2011) utilizaram meio de McCoy 5A suplementado com 20% de soro humano AB⁺, D-glucose (2.4 g/L), gentamicina (40 mg/mL).

O meio de cultura Waymouth (Sigma-Aldrich) foi preparado como descrito por Druilhe *et al* (2007) com algumas alterações com 30% de soro humano do tipo AB⁺ inativado; e meio RPMI 1640 contendo hepes (25 mM), NaHCO₃ (25 mM), hipoxantina (30 mg), gentamicina (20 mg).

O meio McCoy 5A (Gibco) foi preparado como descrito por Russell *et al* (2011) com 20% de soro humano do tipo AB⁺ com modificações utilizando HEPES (6 g/L), NaHCO₃ (2.0 g/L), D-glicose (2.4 g/L), gentamicina (20 mg), hipoxantina (50 mg) e 20% de soro humano do tipo AB⁺ inativado.

4.9.2 Preparação da suspensão de hemácias parasitadas

As amostras de sangue foram ressuspensas em meio de cultura completo para obter um hematócrito a 2%. O meio completo específico para *P. vivax* constituído de meio Waymouth (Sigma - Aldrich®) suplementado com 30% de soro humano do tipo AB⁺ inativado. Foram preparados da seguinte forma: 625 µL de hemácias parasitadas foram adicionadas a 30 mL do meio completo de *P. vivax*, suficientes para a preparação de 2 placas de testes por paciente. A esta suspensão foi adicionada uma mistura padrão de gases (5% de O₂, 5% de CO₂ e N₂ balanceado) para aguardar até o momento do teste.

A partir da preparação da suspensão de hemácias parasitadas procederam-se os testes de suscetibilidade *in vitro* de *P. vivax*, com 14 amostras utilizando a metodologia por análise microscópica e 18 amostras pela metodologia do DELI-test. O período de realização dos testes por análise microscópica e pelo DELI-test foram em momentos distintos.

Os procedimentos do microteste por análise microscópica foram realizados como descrito na secção 4.8.3.1, assim como a análise dos dados na secção 4.8.3.2.

4.9.3 Técnica do DELI-test (*double-site enzyme linked LDH imunodetection*)

O método para avaliação da susceptibilidade do *P. vivax* aos antimaláricos foi o DELI-test como descrito Druilhe *et al* (2007) com modificações descritas em Chehuan *et al* (2013). Usado para quantificação do parasita após o teste com as drogas.

Após a preparação da suspensão de hemácias parasitadas, um volume de 180 μL desta suspensão foi distribuída nos poços da microplaca de 96 poços contendo 20 μL da diluição das drogas padrão, substâncias e extratos previamente solubilizados, em duplicata, além dos poços controles livres de droga de modo a obter as concentrações finais descritas na Tabela 2. As placas foram incubadas em estufa de CO_2 por 48 h a 37°C . Foram confeccionados esfregaços sanguíneos dos poços controle após 24 e 48 h de incubação. Após a incubação a microplaca foi congelada a -20°C até a realização do ELISA-sanduiche.

As microplacas de 96 poços foram sensibilizadas de um dia para o outro (*overnight*) a 4°C com os anticorpos de captura (Mab 11D 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), específicos para pLDH de *P. vivax* (Vista Diagnostics, EUA), diluídos em solução salina tamponada com fosfato (*phosphate-buffered saline*-PBS, Sigma-Aldrich) com 0,5% de albumina bovina (*bovine serum albumin*-BSA, Sigma-Aldrich), sendo posteriormente lavadas com PBS-BSA 0,5% e bloqueadas com PBS-BSA 1%. Após o período de incubação de 48 h a 37°C as microplacas testes contendo hemácias parasitadas foram lisadas por três ciclos de congelamento e descongelamento para a liberação da pLDH (lactato desidrogenase do parasito). Após isso, 100 μL do lisado de cada poço foi transferido para a placa sensibilizada anteriormente com o anticorpo monoclonal Mab 11D, que reage com a pLDH de *P. vivax*. Esta placa foi incubada durante 1 h em câmara úmida à temperatura ambiente. Após cinco lavagens com PBS-BSA 0,5% foi adicionado o segundo anticorpo monoclonal biotilado Mab 19G7 nas placas e incubou-se por 1 h em câmara úmida à temperatura ambiente. Após cinco lavagens com PBS-BSA 0,5%, as placas foram incubadas com estreptavidina-peroxidase (Roche diagnostics) durante 30 min à temperatura ambiente. Depois de nove lavagens com PBS-BSA 0,5%, o substrato TMB (3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina, Invitrogen) foi adicionado. Após 10 min ao abrigo da luz e a temperatura ambiente a reação foi interrompida pela adição de 100 μL de ácido fosfórico (H_3PO_4) 1M. As placas foram lidas em um espectrofotômetro para microplacas (Expert Plus, Asys) em comprimento de onda de 450 nm sendo aferida a densidade óptica (DO).

Os valores de densidade óptica produzidos por cada poço da placa de ELISA corresponde à concentração da proteína pLDH encontrada nas amostras de cultura após 48 h de incubação, e representam indicadores consistentes de crescimento de parasito.

4.9.3.1 Cálculo da concentração inibitória 50% (CI₅₀)

Para a determinação da concentração inibitória 50% (CI₅₀) das substâncias e extratos nos isolados de campo de *P. vivax*, foi utilizado o software Microcal Origin®, baseado na comparação da média das duplicatas de cada concentração, com a média dos controles sem droga, e a CI₅₀ foi calculada mediante regressão linear.

A CI₅₀ das substâncias e extratos para cada isolado de *P. vivax* foi calculada a partir de curvas traçadas contendo na abscissa as concentrações-teste da droga e na ordenada as DOs correspondentes. As curvas ideais produzidas são curvas do tipo sigmoidal, na qual até uma determinada concentração da droga o parasito cresce bem, e a uma dada concentração onde a droga age, existe uma queda brusca na DO, refletindo o não crescimento/maturação do parasito naquela concentração de droga.

4.9.4 Análise estatística

O software estatístico utilizado foi o R 3.4.3 (R Development Core Team, 2018), com os pacotes: drc, epiDisplay, agricolae e Rcmdr. O nível de significância utilizado foi de 5%. A confiança utilizada nos intervalos foi de 95%.

Para avaliar o efeito da droga sobre o parasita usou-se a análise de variância para determinar a droga mais eficiente. Onde a variável resposta são os valores de CI₅₀, enquanto que a fonte de variação são as drogas. Essa análise foi empregada para as espécies de *P. falciparum* e *P. vivax*.

A determinação do efeito foi realizada pelo teste não paramétrico ANOVA, utilizando-se o teste de Kruskal-Wallis e o teste de comparação múltiplas de Bonferroni (AGRESTI e FINLAY, 2012). Utilizou-se também outra estratégia para visualizar as diferenças entre as drogas em relação a variável resposta: o intervalo de confiança bootstrap (AGRESTI e FINLAY, 2012).

5 RESULTADO E DISCUSSÃO

A crescente resistência desenvolvida pelos plasmódios aos antimaláricos habitualmente utilizados tem motivado a busca por novos medicamentos. Testes com novas substâncias isoladas de plantas e seus derivados constituem uma ferramenta importante na descoberta de novas drogas (SILVA *et al.* 2011).

Foram selecionadas 5 substâncias químicas representativas de diferentes classes de produtos naturais e 2 extratos, todos quais já possuíam atividade antimalárica *in vitro* com cepas de *P. falciparum* e cujo estudo fitoquímico estava em andamento no LAPAAM pelos alunos de pós-graduação conforme mencionado na metodologia, porém ainda não haviam sido testados com isolados de campo de *P. vivax*.

As 32 amostras de sangue infectado com *P. vivax* apresentaram parasitemia que variou de 1860 a 20.400 parasitos/ μ L de sangue. As hemácias parasitadas por cada 200 leucócitos foram contados e calculados o número de parasitos/ μ L de sangue pela referência da contagem global de leucócitos do indivíduo. Para os pacientes que não possuíam hemograma necessário para a conversão da parasitemia em μ L de sangue, foi considerado o valor de 6.000 leucócitos (média encontrada nos pacientes com malária em nossa região).

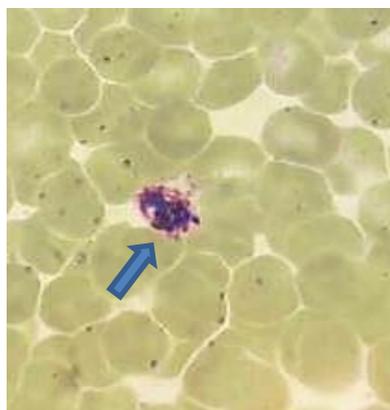
5.1 Viabilidade do *Plasmodium* em meios de cultura diferentes

5.1.1 Viabilidade dos meios de cultura para *P. vivax*

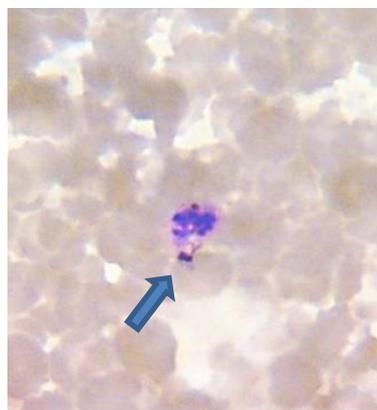
Amostras infectadas de 3 isolados de campo de *P. vivax* foram processadas conforme Druilhe *et al* (2007) e Russell *et al* (2011) com algumas modificações, posto em cultivo em frascos de poliestireno em dois meios de cultura distintos com composto por Waymouth e McCoy 5A descritos na secção 4.9.1. Estes meios têm sido empregados em estudos com *P. vivax* para cultura a curto prazo.

Após as culturas de 48 horas com *P. vivax* em estufa de CO₂ foi observado que em ambos meios de cultura houve maturação dos trofozoítos com crescimento satisfatório evidenciado pela maturação de esquizonte (Figura 6). Os resultados mostraram que foi indiferente a escolha do meio de cultura uma vez que a análises

microscópicas qualitativas e quantitativas apresentam resultados semelhantes de densidades de parasitos. A opção de escolha do meio foi pelo Waymouth (Sigma-Aldrich), pois era o de maior quantidade disponível no momento, além de ser mais prático na preparação com os reagentes.



6a



6b

Figura 6: Viabilidade no cultivo *in vitro* com isolados de *P. vivax* utilizando meio Waymouth (6a) e o meio McCoy (6b).

Estes resultados divergem, em parte, dos encontrados por Roobsoong *et al* (2015) que testou três tipos de meio de cultura: McCoy 5A (HEPES 5.96 g/L, NaHCO₃ 2.0 g/L, D-glicose 2.0 g/L, gentamicina 40 mg/mL), meio RPMI 1640 (HEPES 5.96 g/L, NaHCO₃ 2.0 g/L, D-glicose 1.0 g/L, MgSO₄ 0.016 g/L, KH₂PO₄ 0.026 g/L, CaCl₂ 0.03 g/L, L-ácido ascórbico 0.006 g/L, tiamina 0.010 g/L, hipoxantina 0.01 g/L, gentamicina 40 mg/mL) e Waymouth's. Também foram testados diferentes percentuais de soro que variaram de entre 25 e 50% para cada meio de cultura. Onde os meios RPMI 1640 e o Waymouth em ambos percentuais de soro não resultaram em diferenças discerníveis em densidades de parasitos. Portanto, o meio McCoy apresentou maiores densidades de parasitos quando preparados a 25% de soro AB⁺.

5.1.2 Viabilidade do meio de cultura para *P. falciparum*

No *P. falciparum* a substituição do soro humano utilizado no cultivo de cepas pela albumina comercial (Albumax, Gibco®) utilizada no cultivo de isolados de campo apresentou praticidade, com bom desempenho. Esta substituição de fonte de proteína para os parasitos foi de ordem metodológica do protocolo, justificado pelo padrão mais

uniforme e o controle da qualidade das proteínas. A utilização do Albumax demonstrou praticidade conforme os estudos (BASCO, 2003) com cultivo *in vitro* do *P. falciparum* mostrando que o soro bovino fetal ou Albumax® pode ser um substituto satisfatório para o soro humano, além de eliminar a necessidade de armazenamento e controle do soro no campo (BASCO, 2004).

5.2 Avaliação da cultura dos *Plasmodium* pelo microteste

O tempo médio de incubação para as culturas do Microteste e do DELI-test foi de 48 horas para as espécies de *P. falciparum* e *P. vivax* como descrito em trabalhos Rieckmann *et al* (1978), Andrade-Neto *et al* (2007), Chehuan *et al* (2013) e Pratt-Riccio *et al* (2013).

A Figura 7 mostra três momentos de um microteste com isolados de campo de *P. vivax* no momento inicial do teste; em 7a notam-se trofozoítos jovem (J) e maduro (M); 7b pré-esquizontes e 7c esquizontes após 48 horas indicando a maturação das formas anteriores em concentrações de droga não suficiente para inibir o desenvolvimento do parasito. Esse padrão foi observado na maioria dos isolados testados.

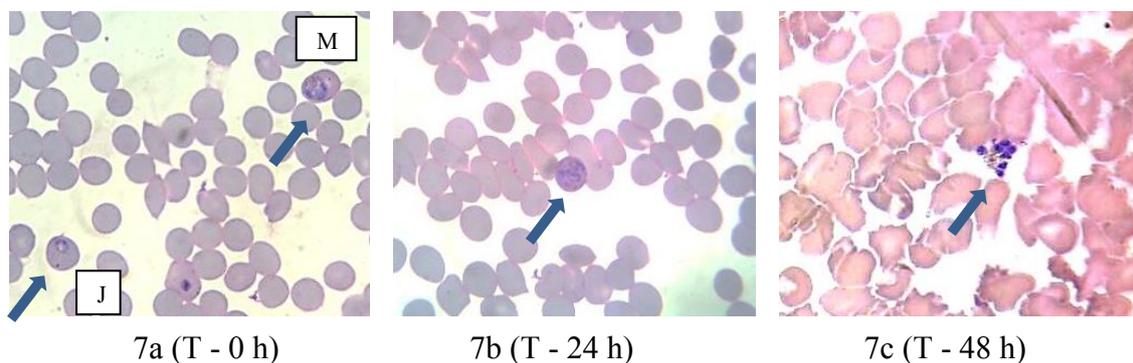


Figura 7: Três momentos de um microteste com isolados de campo de *P. vivax* nas formas de trofozoítos jovem e maduro (7a); pré-esquizontes (7b) e esquizontes (7c).

A Figura 8 mostra o microteste com cepas e isolados de campo de *P. falciparum* pós-cultura de 48 horas.

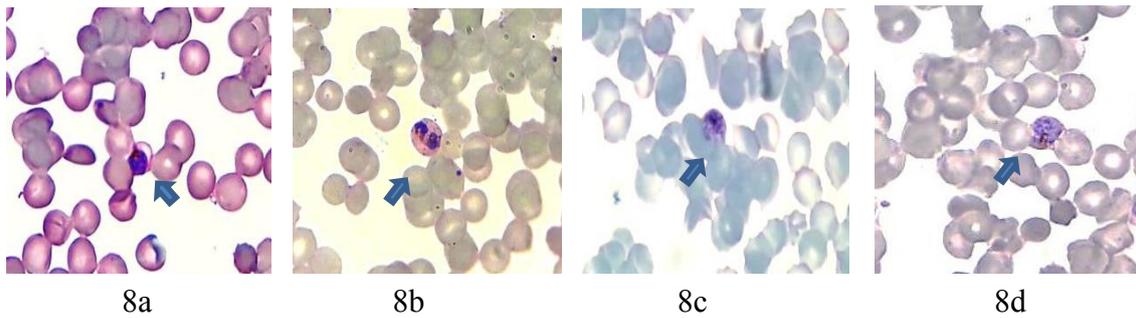


Figura 8: Microteste após 48 horas com duas cepas de *P. falciparum* K1 (8a) e 3D7 (8b) e dois isolados de campo de *P. falciparum* AL (8c) e MRV (8d).

Do total dos 32 testes realizados com *P. vivax*, 2 (6,2%) amostras contaminaram, 6 (18,7%) não mostraram crescimento adequado do parasito e 24 em 32 (75%) isolados completaram o ciclo biológico dos parasitos com maturação de esquizontes nos poços controles no total dos ensaios de microteste e DELI-test para as drogas (Figura 9). O crescimento do parasito nas cepas e isolados de campo *P. falciparum* previamente estabilizado foi satisfatório, obtendo-se 4 de 4 (100%) das amostras para testes.

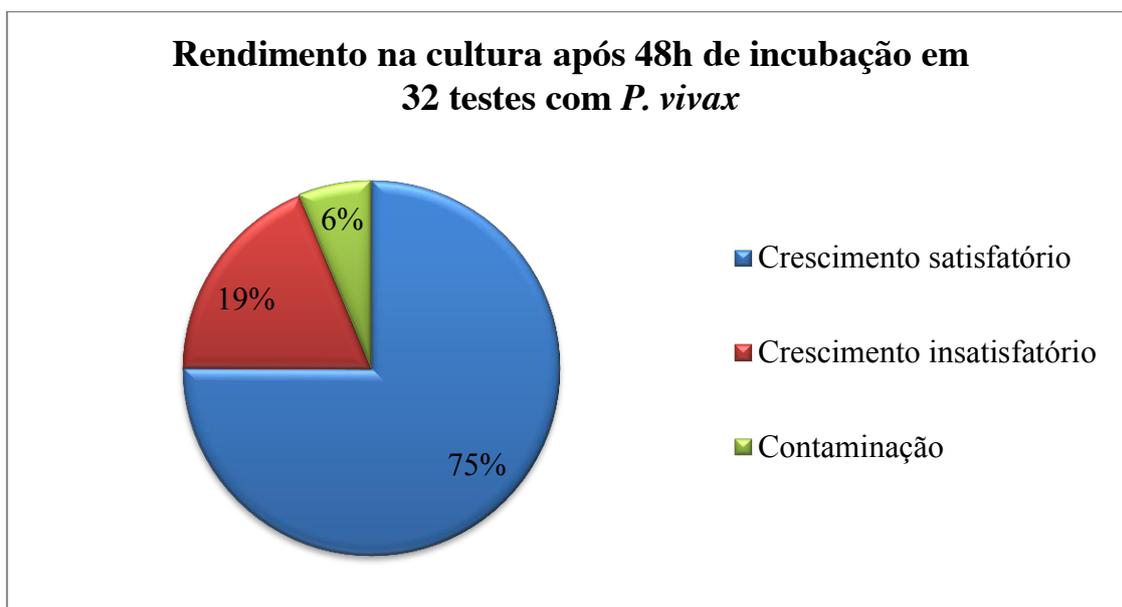


Figura 9: Distribuição dos resultados de cultura limitada de *P. vivax* após o período de incubação.

O rendimento de 24 em 32 (75%) das culturas com *P. vivax* e 4 em 4 (100%) com *P. falciparum* está de acordo com o rendimento em culturas como no trabalho de Aguiar *et al* (2014) que apresentou dados semelhantes, com crescimento do parasito adequado obtido em 9 em 9 (100%) de isolados de campo de *P. falciparum* e em 32 de 47 (68%) de isolados de campo de *P. vivax*. Em outro trabalho Pratt-Riccio *et al* (2013) apresentaram resultados com 70 em 88 (80%) de crescimento adequado do isolados de campo de *P. falciparum* e 132 em 178 (74%) em isolados de campo de *P. vivax*.

5.3 Maturação

As amostras testadas apresentaram maturação dos esquizontes após 48 horas de cultivo para ambas as espécies. Contudo, há um limitante para se avaliar crescimento/maturação em cultivo de *P. vivax*, pois formas maduras de *P. vivax* são frequentemente observadas em amostras de sangue periférico, e tanto a lâmina inicial quanto a pós-cultivo podem apresentar formas jovens e maduras o que pode complicar a avaliação de que houve crescimento/maturação dos parasitos. Daí a dificuldade de começar o teste sincronizado pela presença dessas formas maduras. Além também de haver a dificuldade em se avaliar crescimento do parasito, pois o rompimento de um ou mais esquizontes no início da cultura pode levar ao aumento de parasitemia sem significar que o parasito de fato cresceu bem ao fim de 48 horas.

Por outro lado, para *P. falciparum* de cultura e isolados estabilizados, devido a sincronização são observados principalmente formas jovens do parasito na lâmina inicial e a lâmina pós-cultivo mostrar formas maduras.

5.4 Atividade antimalárica *in vitro* das drogas padrão, substâncias químicas e extratos vegetais

Há centenas de plantas utilizadas popularmente para o tratamento da malária e doenças febris no Brasil (LIMA *et al.* 2015). Contudo, a maioria destas plantas não foi submetida a nenhum tipo de avaliação de atividade antimalárica. Apenas algumas destas espécies possuem estudo fitoquímico preliminares que revelam estruturas químicas com grande potencial como antimalárico. Nos últimos anos vários compostos isolados de

plantas tem sido testado *in vitro* frente ao *P. falciparum* e *in vivo* contra *P. berghei* (POHLIT *et al.* 2013).

O ponto de corte *cut-off* para avaliação de sensibilidade as drogas é estabelecido pela Organização Mundial de Saúde para cloroquina de 100 nM, quinina de 500 nM e artemisinina de 30 nM (WHO, 2007). Alguns trabalhos confirmam o limiar de resistência *in vitro* do *P. falciparum* as drogas como DRUILHE *et al* (2001). Para o *P. vivax*, embora estes valores não estejam bem estabelecidos, a literatura tomou como base valores semelhante aos do *P. falciparum*.

Os testes realizados com *P. falciparum* confirmaram o perfil de resistência da cepa K1 à cloroquina com as concentrações inibitórias 50% (CI₅₀) de 0,17 µg/mL (347 nM) (Tabela 3), assim como a sensibilidade dessa cepa foi confirmado com CI₅₀ da quinina de 0,14 µg/mL (350 nM) estão compatíveis com a literatura (ANDRADE-NETO *et al.* 2007; ROCHA E SILVA *et al.* 2012a; ROCHA E SILVA *et al.* 2015). As drogas padrões mefloquina e diidroartemisinina foram incluídas no estudo e apresentaram valores de CI₅₀ de 0,002 µg/mL (6 nM) e 0,002 µg/mL (8 nM) respectivamente, ambas sensíveis as duas cepas.

O perfil de sensibilidade da cepa 3D7 à cloroquina e quinina está compatível com a literatura com valores de 0,03 µg/mL (60 nM), 0,04 µg/mL (100 nM) respectivamente (ROCHA E SILVA *et al.* 2011; ROCHA E SILVA *et al.* 2015) (Tabela 3). As drogas padrões mefloquina e diidroartemisinina apresentaram valores de CI₅₀ de 0,001µg/mL (3nM) e 0,001µg/mL (4nM) respectivamente.

Concentrações Inibitórias 50% (CI ₅₀) de <i>P. falciparum</i>									
Substâncias e extratos vegetais	Atividade	Cepas padronizadas				Isolados de campo			
		K1		3D7		MRV		AL	
		µg/mL	µM	µg/mL	µM	µg/mL	µM	µg/mL	µM
elipticina	A	0,18	0,73	0,12	0,48	0,12	0,48	0,19	0,77
4-nerolodilcatecol diacetilado	A	0,75	3,7	0,89	4,3	0,87	4,2	0,95	4,6
neosergeolida	MA	0,004	0,008	0,003	0,006	0,002	0,004	0,005	0,01
6α-acetoxypedunina,	AM	3,83	7,0	2,81	5,2	3,8	7,0	3,4	6,2
6α- hidroxideacetilgedunina	AM	2,43	5,3	2,3	4,9	2,8	6,1	2,6	5,7
<i>A. leucostachyus</i> (metanol)	A	7,0	-	6,8	-	7,0	-	7,2	-
<i>X. amazônica</i> (Etanol)	A	8,8	-	8,6	-	9,8	-	9,5	-
<i>X. amazônica</i> (Clorofórmio)	A	7,2	-	7,6	-	7,8	-	7,4	-
cloroquina	R/S	0,17	0,34	0,03	0,06	0,07	0,14	0,08	0,16
diidroartemisinina	S	0,002	0,008	0,001	0,004	0,001	0,004	0,001	0,005
quinina	S	0,14	0,35	0,04	0,10	0,10	0,25	0,09	0,23
mefloquina	S	0,002	0,006	0,001	0,003	0,001	0,004	0,001	0,004

Tabela 3: Concentrações inibitórias 50% (CI₅₀) de duas cepas padronizadas e dois isolados de campo de *P. falciparum* frente a drogas padrão, produtos naturais e derivados semi-sintéticos pelo microteste. A= ativa, MA= muito ativa, AM= atividade moderada, R= resistente, S= sensível.

Os isolados de campo de *P. falciparum* previamente estabilizados em cultura contínua utilizados neste estudo são integrantes do criobanco mantido pela Gerência de Malária da FMT-HVD. Os valores de CI_{50} para os dois isolados de campo previamente estabilizados estão apresentados na Tabela 3. Os resultados dos isolados de campo obtidos aqui confirmam os valores encontrados no trabalho de ROCHA E SILVA *et al.* 2012b que utilizou os mesmos isolados de campo com a média da CI_{50} de 268 ± 129 , 172 ± 40 e $2,1 \pm 1,0$ nM frente à cloroquina, a quinina e a artemisinina, respectivamente, onde todos os isolados de campo foram considerados resistentes à cloroquina e sensíveis à quinina e à artemisinina.

As CI_{50} das substâncias naturais e seus derivados semissintéticos frente a cepas K1, 3D7 e aos dois isolados de campo de *P. falciparum* estão apresentados na Tabela 3.

Os critérios de atividade para as substâncias puras foram os convencionados na literatura (ANDRADE-NETO *et al.* 2007; FLANNERY *et al.* 2013; KRETTLI *et al.* 2009; SANTOS-TORRES *et al.* 2013).

- $CI_{50} > 20 \mu\text{M}$ = inativo
- $20 \mu\text{M} \geq CI_{50} > 5,0 \mu\text{M}$ = atividade moderada
- $5,0 \mu\text{M} \geq CI_{50} > 0,1 \mu\text{M}$ = ativo
- $CI_{50} \leq 0,1 \mu\text{M}$ = muito ativo

A CI_{50} dos extratos testados frente a cepas K1, 3D7 e aos dois isolados de campo de *P. falciparum* estão representados na Tabela 3. Os critérios para classificação da atividade biológica dos extratos vegetais foram os convencionados na literatura (BERTANI *et al.* 2005; KRETTLI *et al.* 2001).

- $CI_{50} > 50 \mu\text{g/mL}$ = inativo
- $50 \mu\text{g/mL} \geq CI_{50} > 10 \mu\text{g/mL}$ = parcialmente ativo
- $10 \mu\text{g/mL} \geq CI_{50} > 1,0 \mu\text{g/mL}$ = ativo
- $CI_{50} \leq 1,0 \mu\text{g/mL}$ = muito ativo

O alcaloide indólico elipticina, isolada a partir do extrato alcalino etanólico da casca de árvore da Amazônia *Aspidosperma vargasii*, foi ensaiado para atividade antimalárica *in vitro* frente às cepas K1, 3D7 e aos isolados de campo MRV e AL de *P. falciparum*. Onde elipticina apresentou melhores valores de atividade com as cepas K1

(CI_{50} de 0,73 μM) e com a 3D7 (CI_{50} de 0,48 μM) (Tabela 3). A atividade de elipticina foi descrita pela primeira vez no trabalho de Andrade-Neto *et al* (2007) com o valor da CI_{50} de 0,07 μM frente à cepa K1. Em trabalhos como de ROCHA E SILVA *et al* (2012a) a elipticina apresentou CI_{50} de 0,81 μM e 0,35 μM frente às cepas K1 e 3D7, respectivamente. Mais recentemente a elipticina foi reavaliada frente às cepas K1 e 3D7 onde exibiu o CI_{50} de 0,81 μM e 0,35 μM , respectivamente (MONTAIA *et al.* 2014).

O derivado semissintético 4-nerolidilcatecol *O,O*-diacetilado obtido a partir da diacetilação de 4-nerolidilcatecol exibiu importante atividade com os valores de CI_{50} de 3,7 e 4,3 μM frente às cepas padronizadas K1 e 3D7 respectivamente, e aos isolados de campo MRV CI_{50} de 4,2 μM e ao AL CI_{50} de 4,6 μM (Tabela 3). A atividade de 4-nerolidilcatecol *O,O*-diacetilado foi descrita em ROCHA E SILVA *et al* (2015) com os valores da CI_{50} de 4,85 μM e 5,57 μM contra as cepas K1 e 3D7, respectivamente.

O quassinóide neosergeolida, isolado a partir de extratos dos caules e raízes de *Picrolemma sprucei*, foi ensaiado para atividade antimalárica *in vitro* frente a cepas K1 (cloroquino-resistente), 3D7 (cloroquino-sensível) e aos dois isolados de campo de *P. falciparum* previamente estabilizados. A potente atividade *in vitro* de neosergeolida reportada previamente foi confirmada aqui com melhores resultados com a cepa 3D7 (CI_{50} de 0,006 μM) e com o isolado MRV (CI_{50} de 0,004 μM) (Tabela 3), onde dentro dos critérios de atividade foi considerada muito ativa. A atividade de neosergeolida foi descrita no trabalho de SILVA *et al* (2009) com o valor da CI_{50} de 0,008 μM frente à cepa K1, idêntico ao observado aqui para essa mesma cepa.

O limonoide 6 α -acetoxigedunina isolado de *C. guianensis* e o seu derivado semi-sintético, 6 α -hidroxidesacetilgedunina tiveram suas CI_{50} avaliadas no presente trabalho. Os valores de CI_{50} de 6 α -acetoxigedunina foram de 7,0 e 5,2 μM contra cepas padronizadas K1 e 3D7 respectivamente, apresentando atividade moderada. As CI_{50} de 6 α -hidroxidesacetilgedunina foram de 6,1 e 4,9 μM contra cepas K1 e 3D7 respectivamente. A atividade de 6 α -acetoxigedunina e 6 α -hidroxidesacetilgedunina foram descritas por Pereira *et al* (2014) contra a cepa K1, onde 6 α -acetoxigedunina apresentou CI_{50} de 7,0 μM e a 6 α -hidroxidesacetilgedunina CI_{50} de 5,0 μM .

Os extratos vegetais obtidos da *A. leucostachyus* (metanol), *X. amazônica* (etanol) e *X. amazônica* (clorofórmio) mostraram boa atividade *in vitro*. O extrato da *A.*

leucostachyus apresentou variação no CI_{50} de 6,8 - 7,2 $\mu\text{g/mL}$ frente às cepas padronizadas e aos isolados de campo. O extrato etanólico da *X. amazônica* apresentou variação no CI_{50} de 8,6 - 9,8 $\mu\text{g/mL}$ e o extrato clorofórmico da *X. amazônica* apresentou variação no CI_{50} de 7,2 - 7,8 $\mu\text{g/mL}$. A atividade dos extratos vegetais foi descrita por LIMA *et al* (2015), onde o extrato metanólico da *A. leucostachyus* apresentou um CI_{50} de 7,1 $\mu\text{g/mL}$, o extrato clorofórmico da *X. amazônica* apresentou um CI_{50} de 7,3 $\mu\text{g/mL}$ frente à cepa W2 (cloroquino-resistente). De acordo com os critérios de atividade todas foram consideradas ativas.

Nas análises abaixo tem-se os resultados para o experimento de *P. falciparum*, onde foi utilizado os intervalos de confiança bootstrap. Os dados mostram que não há evidência de diferença entre as amostras ou das drogas utilizadas. Todos os intervalos apresentam intersecção o que expõe que nenhuma das causas de variação (Droga e amostra) interferem nos valores observados da variável resposta.

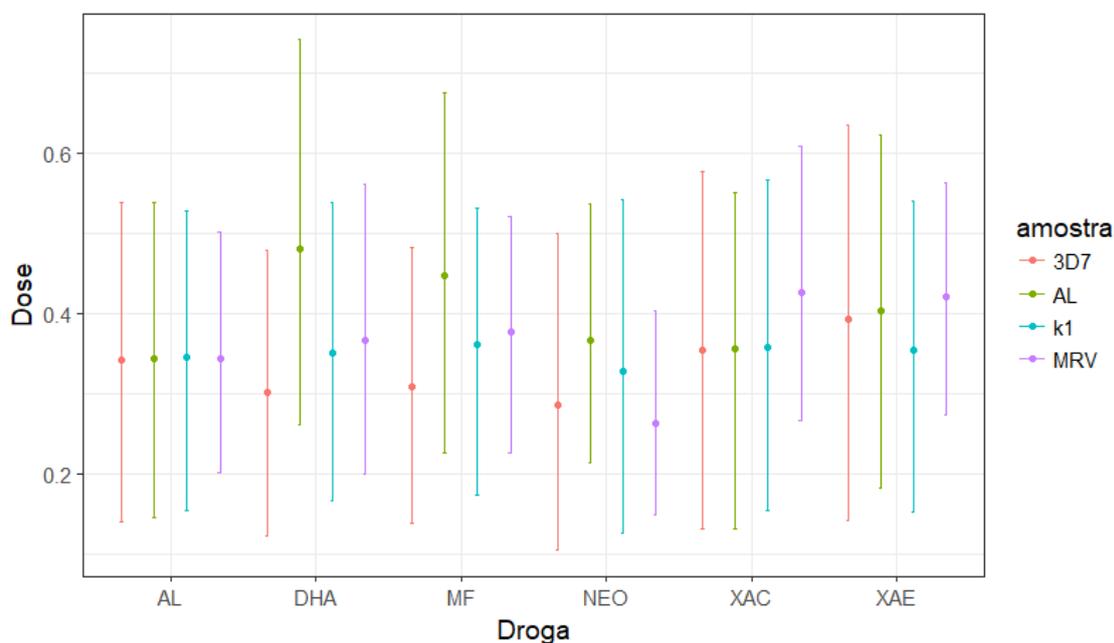


Figura 10 - Intervalos de confiança bootstrap das amostras testadas com *P. falciparum*.

Legenda: AL – *A. leucostachyus*, DHA – diidroartemisinina, MF – mefloquina, NEO – neosergeolida, XA (C/E) – *X. amazônica*.

5.5 Susceptibilidade de isolados de campo de *P. vivax* a produtos naturais

O interesse por se estudar o *P. vivax* em relação ao *P. falciparum* sempre foi menor, por *P. vivax* ser menos grave clinicamente falando. Também, *P. vivax* aparentemente não desenvolve com facilidade resistência aos antimaláricos e não cresce bem *in vitro*, mesmo em cultivos de curto prazo devido à necessidade de reticulócitos. Entretanto, essas condições estão mudando, o que tem justificado um interesse crescente por esse tipo de avaliação. A alta prevalência do *P. vivax* em muitas regiões do globo, inclusive no Brasil, e os relatos cada vez mais frequentes de casos graves por malária *vivax*, aumentaram a preocupação em relação a esta espécie.

Outrossim, são os relatos crescentes de resistência de *P. vivax* à cloroquina e a diminuição de sensibilidade aos outros antimaláricos que preocupam as agências de controle da malária. Até recentemente não havia disponibilidade de um método de cultivo *in vitro* que permitisse tais avaliações, assim como a triagem de novas drogas. Com o desenvolvimento do DELI-test (*double-site enzyme linked LDH immunodetection*), novas perspectivas para o estudo da malária *vivax* predominante na região Amazônica, foram criadas. Contudo, *screening* em larga escala para testes de bibliotecas de compostos com *P. vivax* ainda não são possíveis (POHLIT *et al.* 2013).

Foram testadas 32 amostras de *P. vivax*, onde os resultados de 8 (25%) amostras foram inconclusivos seja por contaminação ou crescimento insatisfatório, sendo considerados como perda. Após a cultura limitada de 48 h, 24 (75%) isolados de campo de *P. vivax* apresentaram curvas interpretáveis de CI_{50} .

Das 24 amostras com curvas interpretáveis de CI_{50} , 12 amostras dos isolados de campo de *P. vivax* foram viáveis pelo Microteste com as substâncias elipticina, 4-nerolodilcatecol diacetilado, neosergeolida, 6 α -acetoxypedunina, 6 α -hidroxideacetilgedunina e os extratos vegetais a partir de *A. leucostachyus* e *X. amazônica*. E 12 amostras de isolados de campo de *P. vivax* foram viáveis pelo DELI-test com as substâncias elipticina, 4-nerolodilcatecol diacetilado, neosergeolida.

Além dos compostos de origem natural, os mesmos parasitos também foram testados frente às drogas cloroquina, quinina, mefloquina e diidroartemisinina. A Tabela 4 apresenta a média das CI_{50} dos isolados de campo de *P. vivax* frente aos produtos naturais e às drogas padrão.

Concentrações Inibitórias 50% (CI ₅₀) de <i>P. vivax</i>			
CI ₅₀ Média ± DP (menor/maior valor)			
Substâncias e extratos vegetais	Atividade	Microteste [μM]	DELI-test [μM]
elipticina	A	2,19 ± 0,77	4,7 ± 1,2
4-nerolodilcatecol diacetilado	A	4,01 ± 0,64	9,0 ± 2,2
neosergeolida	A	0,13 ± 0,05	0,010 ± 0,002
6α-acetoxypedunina,	AM	5,76 ± 0,83	-
6α- hidroxí- deacetilgedunina	AM	5,32 ± 0,92	-
<i>A. leucostachyus</i> (metanol)	PA	13,99 μg/mL ± 2,03	-
<i>X. amazônica</i> (Etanol)	PA	15,65 μg/mL ± 2,37	-
<i>X. amazônica</i> (Clorofórmio)	PA	13, 62 μg/mL ± 3,30	-
cloroquina	S	0,08 ± 3,14	0,07 ± 0,02
diidroartemisinina	S	0,01 ± 0,69	0,002 ± 0,001
quinina	S	0,07 ± 3,26	-
mefloquina	S	0,02 ± 1,18	0,013 ± 0,005

Tabela 4 - Média das concentrações inibitórias 50% (CI₅₀) de isolados de campo de *P. vivax* frente a drogas padrão, produtos naturais e derivado semissintético pelo Microteste e DELI-test. A= ativa, MA= muito ativa, AM= atividade moderada, PA= parcialmente ativo, S= sensível.

De acordo com as médias da CI_{50} do *P. vivax* em μM e baseado nos critérios para se avaliar a atividade das substância da página 72, as substância elipticina (CI_{50} 2,2 μM), 4-nerolidilcatecol diacetilado (CI_{50} 4,0 μM) e neosergeolida (CI_{50} 0,13 μM) foram consideradas ativas, contudo as substâncias 6 α -acetoxypedunina (CI_{50} 5,3 μM) e 6 α -hidroxi- deacetilgedunina (CI_{50} 5,7 μM) tiveram atividade moderada. O perfil das drogas padrão foi muito ativo (CI_{50} 0,01 – 0,08 μM) todas consideradas sensíveis (Tabela 4).

P. vivax exibiu sensibilidade diminuída aos extratos vegetais de *A. leucostachyus* (metanol), *X. amazônica* (etanol) e *X. amazônica* (clorofórmio) que tiveram suas CI_{50} de 13,99, 15,65 e 13,62 $\mu\text{g/mL}$. Enquanto os valores de CI_{50} dos testados com *P. falciparum* para os extratos vegetais a partir de *A. leucostachyus* e *X. amazônica* para as cepas padronizadas e isolados de campo tiveram maior atividade.

Nas análises abaixo para os valores do CI_{50} de *P. vivax*, verificou-se diferença significativa entre as drogas ($p < 0,001$). Os dados mostram que existe pelo menos um par que apresenta diferença significativa (Tabela 5). Para confirmar esse fato, a Tabela 6 contém as comparações múltiplas de cada par formado entre as drogas do experimento. As combinações que apresentam valores inferiores a 0.05 são os pares que diferem significativamente ao nível de 5%.

Droga	Estatísticas dos valores de IC 50							n
	Média	Desvio padrão	Mínimo	1º quartil	Mediana	3º quartil	Máximo	
3T	2,43	0,92	1,00	1,75	2,50	3,12	3,94	11
4NC2	0,73	0,60	0,18	0,22	0,39	1,18	1,88	11
4T	3,11	0,83	1,93	2,65	3,05	3,62	4,51	11
AL	13,99	2,03	10,60	12,35	14,80	15,75	15,90	11
CL	43,16	3,29	40,00	40,50	42,10	44,90	50,80	11
DHA	3,90	0,72	3,08	3,30	3,87	4,37	5,08	11
EL	0,44	0,71	0,03	0,07	0,11	0,28	1,87	11
MQ	8,10	1,18	6,57	7,05	8,10	9,00	9,80	11
NEO	0,07	0,05	0,01	0,04	0,07	0,10	0,17	11
QN	29,20	3,41	24,40	26,80	29,00	32,55	33,40	11
XAC	13,76	3,17	10,10	10,60	13,70	16,35	18,30	11
XAE	15,65	2,37	11,50	14,20	15,70	17,25	19,70	11

Tabela 5 - Análises descritivas das variáveis envolvidas no experimento com *P. vivax*.

Legenda: 3T – 6 α - hidroxi- deacetilgedunina, 4NC-Ac2 – 4-nerolidilcatecol diacetilado, 4T – 6 α -acetoxypedunina, AL – *A. leucostachyus*, CL – cloroquina, DHA – diidroartemisinina, EL – elipticina, MQ – mefloquina, NEO – neosergeolida, QN – quinina, XA (C/E) – *X. amazônica*.

	3T	4NC2	4T	AL	CL	DHA	EL	MQ	NEO	QN	XAC
4NC2	0.03280	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4T	1	0.00533	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AL	0.00535	0.00531	0.00535	-	-	-	-	-	-	-	-
CL	0.00535	0.00531	0.00535	0.00533	-	-	-	-	-	-	-
DHA	0.13200	0.00531	1	0.00533	0.00533	-	-	-	-	-	-
EL	0.02574	1	0.00535	0.00533	0.00533	0.00533	-	-	-	-	-
MQ	0.00019	0.00533	0.00019	0.00535	0.00535	0.00535	0.00535	-	-	-	-
NEO	0.00531	0.00525	0.00531	0.00528	0.00528	0.00528	1	0.00531	-	-	-
QN	0.00535	0.00531	0.00535	0.00533	0.00533	0.00533	0.00533	0.00535	0.00528	-	-
XAC	0.00525	0.00521	0.00525	1	0.00523	0.00523	0.00523	0.00525	0.00518	0.00523	-
XAE	0.00535	0.00531	0.00535	1	0.00533	0.00533	0.00533	0.00535	0.00528	0.00533	1

Tabela 6 - Comparações múltiplas de Bonferroni no experimento com *P. vivax*.

Legenda: 3T – 6 α - hidroxí- deacetilgedunina, 4NC-Ac2 – 4-nerolidilcatecol diacetilado, 4T – 6 α -acetoxýgedunina, AL – *A. leucostachyus*, CL – cloroquina, DHA – diidroartemisinina, EL – elipticina, MQ – mefloquina, NEO – neosergeolida, QN – quinina, XA (C/E) – *X. amazônica*.

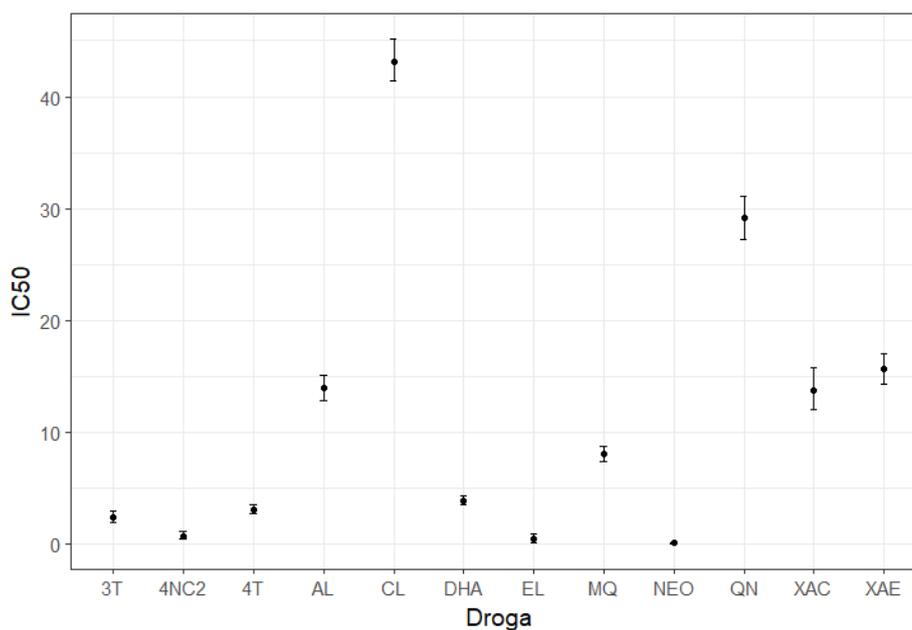


Figura 11 - Intervalos de confiança bootstrap para as doses de drogas no experimento com *P. vivax*.

Legenda: 3T – 6 α - hidroxí- deacetilgedunina, 4NC-Ac2 – 4-nerolidilcatecol diacetilado, 4T – 6 α -acetoxýgedunina, AL – *A. leucostachyus*, CL – cloroquina, DHA – diidroartemisinina, EL – elipticina, MQ – mefloquina, NEO – neosergeolida, QN – quinina, XA (C/E) – *X. amazônica*.

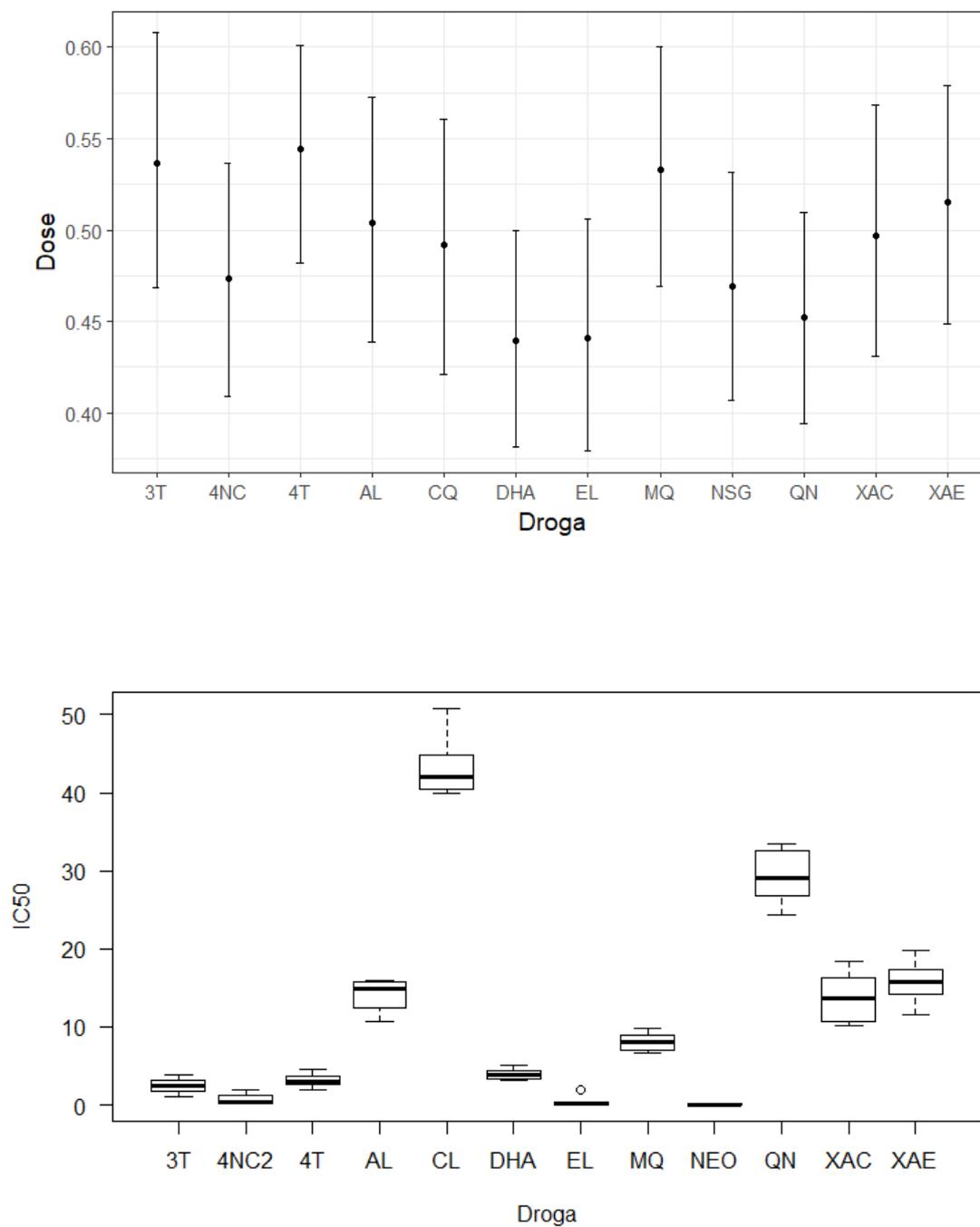


Figura 11 - Intervalos de confiança bootstrap para as doses de drogas no experimento com *P. vivax* (Continuação).

Legenda: 3T – 6 α - hidroxí- deacetilgedunina, 4NC-Ac2 – 4-nerolidilcatecol diacetilado, 4T – 6 α - acetoxýgedunina, AL – *A. leucostachyus*, CL – cloroquina, DHA – diidroartemisinina, EL – elipticina, MQ – mefloquina, NEO – neosergeolida, QN – quinina, XA (C/E) – *X. amazônica* (Continuação).

A utilização de isolados de campo em estudos de atividade antimalárica *in vitro* permite a avaliação real do perfil de susceptibilidade, dos parasitos circulantes em determinadas regiões às drogas tradicionais e a produtos naturais. Estes estudos normalmente são acompanhados de resultados obtidos com cepas padrão cujo perfil de sensibilidade é estavelmente pré-estabelecido, sendo um importante fator de validação do método (ROCHA E SILVA *et al.* 2012b). Não existe ainda, para *P. vivax*, um limiar de sensibilidade/resistência bem determinado, entretanto, na ausência de um valor determinado para *P. vivax*, utilizamos como referência o limiar já determinado para *P. falciparum* à cloroquina de 100 nM, para quinina de 500 nM e para artemisinina de 30 nM (WHO, 2007).

Todos os isolados de campo de *P. vivax* foram considerados sensíveis às drogas estudadas. Ao se determinar as CI_{50} dos isolados de campo às drogas cloroquina, quinina, mefloquina e diidroartemisinina objetivou-se não monitorar a resistência local do *P. vivax*, mas conhecer o perfil de sensibilidade destes isolados de campo frente os antimaláricos tradicionais, uma vez que estavam sendo testados frente aos produtos naturais. Considerando-se o número reduzido de amostras de *P. vivax*, os resultados aqui alcançados foram todos sensíveis aos testes o efeito da droga sobre o parasita. No estudo de Chehuan *et al.* (2013) na região amazônica foram encontrados 12 isolados de campo de *P. vivax* resistentes a cloroquina ($CI_{50} > 100$ nM) em 112 amostras pesquisadas e 3 amostras resistentes a mefloquina em 47 isolados testados. A perda de amostras do referido estudo no que se refere a testes válidos foi estimada em 50%. São considerados como perda testes nos quais os poços controles não se encontram parasitados após as 48 h de incubação, ou testes em que as leituras de DO não resultaram em curvas de concentração-respostas.

Os isolados de campo de *P. vivax* apresentaram alto grau de susceptibilidade aos produtos naturais testados, sendo neosergeolida o composto mais ativo ($CI_{50} = 0,13$ μ M no microteste) e ($CI_{50} = 0,01$ μ M no DELI-test). Aparentemente os isolados de campo de *P. vivax* foram um pouco menos sensíveis que as cepas de *P. falciparum* previamente estudadas para os mesmos compostos, fato que foi mais acentuado para elipticina ($CI_{50} = 2,2$ μ M, microteste) e ($CI_{50} = 4,7$ μ M, DELI-test) em relação a cepa K1 de *P. falciparum* ($CI_{50} = 0,73$ μ M) e 3D7 ($CI_{50} = 0,48$ μ M) que apresentaram maior atividade.

Alguns estudos mostram que o *P. vivax* apresenta perfil de sensibilidade diferente do *P. falciparum* também às drogas tradicionais. Tem sido sugerido, por exemplo, que o *P. vivax* é intrinsecamente resistente aos antifolatos (YOUNG; BURGESS 1959) e Russell *et al* (2008) demonstraram que trofozoítas de *P. vivax* são consideravelmente mais resistentes à cloroquina que trofozoítas de *P. falciparum* no teste de maturação *in vitro*. Estes fatos mostram que a extrapolação dos resultados do *P. falciparum* para o *P. vivax* deve ser feita com a devida atenção.

Algumas limitações no estudo foram o pequeno número de amostras de isolados de campo de *P. vivax*; a falta de um padrão de corte CI_{50} para a caracterização da susceptibilidade em isolados de campo de *P. vivax*. O ensaio DELI é um teste menos demorado que outros, porém mais efetivo em relação ao *P. falciparum* quanto ao tempo de execução. Apesar de serem dados preliminares sobre a avaliação da susceptibilidade *in vitro* de isolados de campo do *P. vivax* frente a substâncias antimaláricas, os dados provenientes deste trabalho são informações confiáveis e podem ser usados como uma base para futuros estudos usando a mesma técnica.

6 CONCLUSÃO

- Foi possível determinar a concentração inibitória de 50% (CI₅₀) dos isolados de *Plasmodium vivax* frente às substâncias naturais elipticina, 4-Nerolidilcatecol diacetilado, neosergeolida, 6 α -acetoxygedunina, 6 α - hidroxidesacetilgedunina e os extratos *Andropogon leucostachyus* (metanol), *Xylopiã amazônica* (etanol) e *Xylopiã amazônica* (clorofórmio), assim como também as drogas a difosfato de cloroquina, diidroartemisinina, cloridrato de quinina e cloridrato de mefloquina estabelecendo o perfil destes fármacos na inibição dos parasitos.
- O perfil de sensibilidade dos isolados de campo às drogas padrão está compatível com a literatura onde todos foram sensíveis a cloroquina, quinina, diidroartemisinina e mefloquina.
- O produto natural mais ativo neste trabalho foi o quassinóide neosergeolida com CI₅₀ de 0,13 μ M no microteste e CI₅₀ de 0,01 μ M no DELI-test com *P. vivax* e no microteste com *P. falciparum* que variou de 0,002 -0,01 μ M com cepas e isolados de campo.
- Embora os valores de CI₅₀ dos produtos naturais sejam inferiores aqueles encontrados para o *P. falciparum*, estas substâncias apresentaram boa atividade frente o *P. vivax*.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRESTI, A; FINLAY, B. Métodos Estatísticos para as Ciências Sociais. Tradução Lori Viali. 4 ed. Porto Alegre: Penso, 2012.

AGUIAR, A. C. C. *et al.* *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* *ex vivo* susceptibility to anti-malarials and gene characterization in Rondônia, West Amazon, Brazil, **Malaria Journal**, v. 13, n. 73, 2014.

ALECRIM, M. D. G. C.; ALECRIM, W.; MACÊDO, V. *Plasmodium vivax* resistance to chloroquine (R2) and mefloquine (R3) in Brazilian Amazon region. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, n. 1, p. 67-68, 1999.

AMARATUNGA, C. *et al.* *Plasmodium falciparum* founder populations in western Cambodia have reduced artemisinin sensitivity *in vitro*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 8, p. 4935-4937, 2014.

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

AMORIM, R. C. Contribuições para o conhecimento da composição química e atividade biológica de infusões, extratos e quassinoides obtidos da *Picrolemma sprucei* Hook. f. (Simaroubaceae). Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2009.

ANDRADE-NETO, V. F. *et al.* *In vitro* inhibition of *Plasmodium falciparum* by substances isolated from Amazonian antimalarial plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 3, p. 359-366, 2007.

ANSTEY, N. M. *et al.* The pathophysiology of vivax malaria. **Trends in parasitology**, v. 25, n. 5, p. 220-227, 2009.

ANTINORI, S. *et al.* Imported *Plasmodium vivax* malaria with severe thrombocytopaenia: can it be severe malaria or not? **Malaria journal**, v. 15, n. 1, p. 1, 2016.

AUTINO, B. *et al.* Pathogenesis of malaria in tissues and blood. **Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases**, v. 4, n. 1, p. 2012061, 2012.

BAER, K. *et al.* Kupffer cells are obligatory for *Plasmodium yoelii* sporozoite infection of the liver. **Cellular microbiology**, v. 9, n. 2, p. 397-412, 2007.

BARNWELL JW, GALINSKI MR. Invasion of vertebrate cells: erythrocytes. In: Sherman IW, editor. **Malaria: Parasite Biology, Pathogenesis, and Protection**. Washington, DC: ASM Press; p. 93-120, 1998.

BASCO, L. K. Molecular epidemiology of malaria in Cameroon. XV. Experimental studies on serum substitutes and supplements and alternative culture media for *in vitro* drug sensitivity assays using fresh isolates. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 69, p. 168-73, 2003.

BASCO, L.K. Molecular epidemiology of malaria in Cameroon. XX. Experimental studies on various factors of *in vitro* drug sensitivity assays using fresh isolates of *Plasmodium falciparum*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 70 n. 5, p. 474-80, 2004.

BATTLE, K. E. *et al.* The global public health significance of *Plasmodium vivax*. 2012.

BENNETT, T. N. *et al.* Novel, rapid, and inexpensive cell-based quantification of antimalarial drug efficacy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 5, p. 1807-1810, 2004.

BERTANI, S. *et al.* Evaluation of French Guiana traditional antimalarial remedies. **Journal Ethnopharmacol**, v. 98, n. 1-2, p. 45-54, 2005.

BOLETIM DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE 2016, Fundação de Vigilância m Saúde no Amazonas, n. 204, 2016.

BOLETIM DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE 2017, Fundação de Vigilância m Saúde no Amazonas, 2017.

BONNEFOY, S.; MÉNARD, R. Deconstructing export of malaria proteins. **Cell**, v. 134, n. 1, p. 20-22, 2008.

BORLON, C. *et al.* Cryopreserved *Plasmodium vivax* and cord blood reticulocytes can be used for invasion and short term culture. **International Journal for Parasitology**, v. 42, n. 2, p. 155-160, 2012.

BOUSEMA, T.; DRAKELEY, C. Epidemiology and infectivity of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* gametocytes in relation to malaria control and elimination. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 2, p. 377-410, 2011.

BRASIL-MINISTÉRIO DA SAÚDE/ FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. Manual de Terapêutica da Malária/ Colaboração de Agostinho Cruz Marques [et al]. Brasília: 2001.

BRASSEUR, P. *et al.* Evaluation of *in vitro* drug sensitivity of antimalarials for *Plasmodium falciparum* using a colorimetric assay (DELI-microtest). **Medecine Tropicale: Revue Du Corps de Sante Colonial**, v. 61, n. 6, p. 545-547, 2000.

BRUCE, M. *et al.* Commitment of the malaria parasite *Plasmodium falciparum* to sexual and asexual development. **Parasitology**, v. 100, n. 02, p. 191-200, 1990.

BRUCE-CHWATT, L. J. *et al.* Chemotherapy of malaria. WHO Monogr. 1986.

CARLTON, J. M. *et al.* Comparative evolutionary genomics of human malaria parasites. **Trends in Parasitology**, v. 24, n. 12, p. 545-550, 2008.

CARLTON, J. M.; SINA, B. J.; ADAMS, J. H. Why is *Plasmodium vivax* a neglected tropical disease? **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 6, p. e1160, Jun 2011.

CARTER, R.; NIJHOUT, M. M. Control of gamete formation (exflagellation) in malaria parasites. **Science**, v. 195, n. 4276, p. 407-409, 1977.

CARVALHO, B. O. *et al.* On the cytoadhesion of *Plasmodium vivax* infected erythrocytes. **Journal of Infectious Diseases**, v. 202, n. 4, p. 638-647, 2010.

CHAIJAROENKUL, W.; BANGCHANG, K.N.; MUNGTHIN, M.; and WARD, S.A. In vitro antimalarial drug susceptibility in Thai border areas from 1998-2003. **Malaria journal**, v. 4, p. 37, 2005.

CHEHUAN, Y. F. *et al.* In vitro chloroquine resistance for *Plasmodium vivax* isolates from the Western Brazilian Amazon. **Malaria journal**, v. 12, n. 1, p. 1, 2013.

CHEN *et al.* Competition between *Plasmodium falciparum* strains in clinical infections during *in vitro* culture adaptation. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 24, p. 105–110, 2014.

CHIYAKA, C.; GARIRA, W.; DUBE, S. Effects of treatment and drug resistance on the transmission dynamics of malaria in endemic areas. **Theoretical population biology**, v. 75, n. 1, p. 14-29, 2009.

CHOTIVANICH, K. *et al.* *Plasmodium vivax* adherence to placental glycosaminoglycans. **PLoS One**, v. 7, n. 4, p. e34509, 2012.

COLLIGNON, P. Chloroquine Resistance in *Plasmodium vivax*. **Journal of Infectious Diseases**, v. 164, n. 1, p. 222-223, 1991.

CRUZ, L.R.; SPANGENBERG, T.; LACERDA, M.V.; and WELLS, T.N. Malaria in South America: a drug discovery perspective. **Malaria journal**, v.12, p. 168, 2013.

DAMA *et al.* Reduced ex vivo susceptibility of *Plasmodium falciparum* after oral artemether–lumefantrine treatment in Mali. **Malaria journal**, v. 16, p. 59, 2017.

DANESHVAR, C. *et al.* Clinical and laboratory features of human *Plasmodium knowlesi* infection. **Clinical infectious diseases**, v. 49, n. 6, p. 852-860, 2009.

DESAKORN, V. *et al.* Semi-quantitative measurement of *Plasmodium falciparum* antigen PfHRP2 in blood and plasma. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 91, n. 4, p. 479-483, 1997.

DESJARDINS, R. E. *et al.* Quantitative assessment of antimalarial activity *in vitro* by a semiautomated microdilution technique. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 16, n. 6, p. 710-718, 1979.

DIGGS, C. *et al.* Protein synthesis *in vitro* by cryopreserved *Plasmodium falciparum*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 24, n. 5, p. 760-763, 1975.

DONDORP, A. M. *et al.* Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. **New England Journal of Medicine**, v. 361, n. 5, p. 455-467, 2009.

DRUILHE, P. *et al.* A colorimetric *in vitro* drug sensitivity assay for *Plasmodium falciparum* based on a highly sensitive double-site lactate dehydrogenase antigen-capture enzyme-linked immunosorbent assay. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 64, n. 5, p. 233-241, 2001.

DRUILHE, P. *et al.* Improved assessment of *Plasmodium vivax* response to antimalarial drugs by a colorimetric double-site plasmodium lactate dehydrogenase antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 6, p. 2112-2116, jun, 2007.

EGAN, T. J. Haemozoin formation. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 157, n. 2, p. 127-136, 2008.

EJIGIRI, I.; SINNIS, P. *Plasmodium* sporozoite–host interactions from the dermis to the hepatocyte. **Current Opinion in Microbiology**, v. 12, n. 4, p. 401-407, 2009.

FERREIRA M. Malária: Conceitos, etiologia e ciclo evolutivo. In: Veronesi, R.; FOCACCIA, R. Tratado de infectologia. Atheneu, p. 1598-1593, São Paulo, 2005.

FLANNERY, E. L.; CHATTERJEE, A. K.; WINZELER, E. A. Antimalarial drug discovery - approaches and progress towards new medicines. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 12, p. 849-62, Dec 2013.

FREVERT, U. *et al.* *Plasmodium* sporozoite passage across the sinusoidal cell layer. In: (Ed.). **Molecular Mechanisms of Parasite Invasion**: Springer, p.182-197, 2008.

FURUYA, T. Reticulocytes from cryopreserved erythroblasts support *Plasmodium vivax* infection *in vitro*. **Parasitology International**, v. 63, n. 2, p. 278–284. abril, 2014.

GALINSKI, M. R. *et al.* A reticulocyte-binding protein complex of *Plasmodium vivax* merozoites. **Cell**, v. 69, n. 7, p. 1213-1226, 1992.

GALINSKI, M. R.; BARNWELL, J. W. *Plasmodium vivax*: who cares? **Malaria Journal**, v. 7, n. 1, p. 1, 2008.

GALINSKI, M. R.; MEYER, E.; BARNWELL, J. W. *Plasmodium vivax*: modern strategies to study a persistent parasite's life cycle. **Advances in Parasitology**, v. 81, p. 1-26, 2013.

GAMA, B. E. *et al.* Chemoresistance of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* parasites in Brazil: consequences on disease morbidity and control. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. I, p. 159-166, 2011.

GARG, M. *et al.* Vivax malaria resistant to chloroquine: case reports from Bombay. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 89, n. 6, p. 656-657, 1995.

GENTON, B. *et al.* *Plasmodium vivax* and mixed infections are associated with severe malaria in children: a prospective cohort study from Papua New Guinea. **PLoS Medicine**, v. 5, n. 6, p. e127, 2008.

GETHING, P. W. *et al.* A long neglected world malaria map: *Plasmodium vivax* endemicity in 2010. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 9, p. e1814, 2012.

GIBSON *et al.* *Plasmodium falciparum* HRP2 ELISA for analysis of dried blood spot samples in rural Zambia, **Malaria Journal**, v. 16, p. 350, 2017.

GONÇALVES, L. A.; CRAVO, P.; FERREIRA, M. U. Emerging *Plasmodium vivax* resistance to chloroquine in South America: an overview. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 5, p. 534-539, 2014.

GOLENSER J., WAKNINE J., KRUGLIAK M., HUNT N., GRAU G.: Current perspectives on the mechanism of action of artemisinins. **International Journal for Parasitology**, v.36, p. 1427 – 41, 2006;

GRAU, G. E. R.; CRAIG, A. G. Cerebral malaria pathogenesis: revisiting parasite and host contributions. **Future Microbiology**, v. 7, n. 2, p. 291-302, 2012.

GREISCHAR, M. A. *et al.* Synchrony in Malaria Infections: How Intensifying Within-Host Competition Can Be Adaptive. **The American Naturalist**, v. 183, n. 2, p. 36-49, 2012.

GRIMBERG, B. T. Methodology and application of flow cytometry for investigation of human malaria parasites. **Journal of Immunological Methods**, v. 367, n. 1, p. 1-16, 2011.

GUERIN, P. J. *et al.* Malaria: current status of control, diagnosis, treatment, and a proposed agenda for research and development. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 2, n. 9, p. 564-573, 2002.

GUILBRIDE, D. L.; GUILBRIDE, P. D.; GAWLINSKI, P. Malaria's deadly secret: a skin stage. **Trends in Parasitology**, v. 28, n. 4, p. 142-150, 2012.

GUTTERY, D. S.; HOLDER, A. A.; TEWARI, R. Sexual development in *Plasmodium*: lessons from functional analyses. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 1, p. e1002404, 2012.

HÄNSCHEID, T.; MELO-CRISTINO, J.; PINTO, B. G. Automated detection of malaria pigment in white blood cells for the diagnosis of malaria in Portugal. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 64, n. 5, p. 290-292, 2001.

HARINASUTA, T. Chloroquine resistant falciparum malaria in Thailand. **Lancet** ii:657–660. 1965.

HAY, S. I. *et al.* A world malaria map: *Plasmodium falciparum* endemicity in 2007. **PLoS Medicine**, v. 6, n. 3, p. e1000048, 2009.

HENRIQUE, M. C.; NUNOMURA, S. M.; POHLIT, A. M. Alcaloides indólicos de cascas de *Aspidosperma vargasii* e *A. desmanthum*. **Química Nova**, v. 33, n. 2, p. 284-287, 2010.

IMWONG, M. *et al.* Gene amplification of the multidrug resistance 1 gene of *Plasmodium vivax* isolates from Thailand, Laos, and Myanmar. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 7, p. 2657-2659, 2008.

SCHMIDT, J. T. *et al.* The Potential of Secondary Metabolites from Plants as Drugs or Leads Against Protozoan Neglected Diseases—Part I. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 14, p. 2128-2175, 2012.

JACOBBERGER, J. W.; HORAN, P. K.; HARE, J. D. Analysis of malaria parasite-infected blood by flow cytometry. **Cytometry**, v. 4, n. 3, p. 228-237, 1983.

JIMENEZ-DIAZ, M. B. *et al.* Improvement of detection specificity of *Plasmodium*-infected murine erythrocytes by flow cytometry using autofluorescence and YOYO-1. **Cytometry Part A**, v. 67, n. 1, p. 27-36, 2005.

JOHNSON, J. D. *et al.* Assessment and continued validation of the malaria SYBR green I-based fluorescence assay for use in malaria drug screening. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 6, p. 1926-1933, 2007.

KARL, S. *et al.* A comparative study of a flow-cytometry-based assessment of *in vitro Plasmodium falciparum* drug sensitivity. **Malaria Journal**, v. 8, n. 1, p. 1, 2009.

KATZUNG, B., Basic and Clinical Pharmacology. 10th ed. 2006.

KAUR, K. *et al.* Antimalarials from nature. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 9, p. 3229-3256, 2009.

KITCHEN, S. The Infection of Reticulocytes by *Plasmodium vivax*. **American Journal of Tropical Medicine**, v. 18, n. 4, p. 347-359, 1938.

KOCHAR, D. K. *et al.* *Plasmodium vivax* malaria. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 1, p. 132-4, 2005.

KOSAISAVEE, V. *et al.* The genetic polymorphism of *Plasmodium vivax* genes in endemic regions of Thailand. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 4, n. 12, p. 931-936, 2011.

KRETTLI, A. U. *et al.* The search for new antimalarial drugs from plants used to treat fever and malaria or plants randomly selected: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 8, p. 1033-42, 2001.

KRETTLI, A. U.; ADEBAYO, J. O.; KRETTLI, L. G. Testing of natural products and synthetic molecules aiming at new antimalarials. **Current Drug Targets**, v. 10, n. 3, p. 261-70, 2009.

KUPCHAN, S. M. *et al.* Tumor inhibitors. 100. Isolation and structural elucidation of bruceantin and bruceantinol, new potent antileukemic quassinoids from *Brucea antidysenterica*. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 40, n. 5, p. 648-654, 1975.

KYES, S.; HORROCKS, P.; NEWBOLD, C. Antigenic variation at the infected red cell surface in malaria. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 673-707, 2001.

KYLE, D.E.; WEBSTER, H.K.; MILHOUS, W.K. *In vitro* antimalarial drug susceptibility testing: Methods and correlation with *in vivo* efficacy. MIM/TDR Antimalarial Drug resistance Network. Multilateral Initiative on Malaria (MIM)/UNDP/World Bank/WHO Special Program for Research e Training in Tropical Diseases (TDR), 2002.

LAMBROS, C.; VANDERBERG, J. P. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. **Journal Parasitology**, v. 65, n. 3, p. 418-20, 1979.

LARÊDO, A. P. A. Utilização do DELI-teste para avaliação da sensibilidade *in vitro* do *Plasmodium vivax* à cloroquina em condições de campo no município de Tucuruí, Pará. Dissertação (Mestrado em Doenças Tropicais) – Universidade Federal do Pará, 2007.

LEANG, R. *et al.* Evidence of *Plasmodium falciparum* malaria multidrug resistance to artemisinin and piperazine in Western Cambodia: dihydroartemisinin-piperazine open-label multicenter clinical assessment. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 8, p. 4719-4726, 2015.

LEICON, 2015. Disponível em: <http://www.leicon.com/sandwich_elisa>.

LI, J.; HAN, E. T. Dissection of the *Plasmodium vivax* reticulocyte binding-like proteins (PvRBPs). **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 426, n. 1, p. 1-6, 2012.

LIMA, R. B. *et al.* *In vitro* and *in vivo* anti-malarial activity of plants from the Brazilian Amazon. **Malaria Journal**, v. 14, n. 1, p. 1, 2015.

LIMA, R. B. S. Levantamento sistemático de plantas antimaláricas e conhecimento químico e farmacológico contra a malária de plantas utilizadas na Região Amazônica. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas, 2015.

LOPES, S. C. *et al.* Paucity of *Plasmodium vivax* mature schizonts in peripheral blood is associated with their increased cytoadhesive potential. **Journal of Infectious Diseases**, v. 209, n. 9, p. 1403-1407, 2014.

MAKLER, M. *et al.* Parasite lactate dehydrogenase as an assay for *Plasmodium falciparum* drug sensitivity. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 48, n. 6, p. 739-741, 1993.

MANDAL, S. Epidemiological aspects of vivax and falciparum malaria: global spectrum. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 4, p. S13-S26, 2014.

MARLAR, T. *et al.* Development of resistance to chloroquine by *Plasmodium vivax* in Myanmar. 1995.

MARKUS M. B. Do hypnozoites cause relapse in malaria? **Trends in Parasitology**, v. 31, n. 6, p. 239-245, jun 2015.

MARQUES, M. M. *et al.* *Plasmodium vivax* chloroquine resistance and anemia in the western Brazilian Amazon. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 1, p. 342-347, 2014.

MARUDG, 2010. Disponível em: <<https://marudg.wordpress.com/2010/03/23/ciclo-de-vida-del-parasito-de-la-malaria/>> Acesso em: 24 maio 2015.

MELO, G. C. *et al.* Expression levels of *pvcrt-o* and *pvmdr-1* are associated with chloroquine resistance and severe *Plasmodium vivax* Malaria in patients of the Brazilian Amazon. **Plos One**, v. 9, n.8, p. e105922, 2014.

MILLER, L. H.; GOOD, M. F.; MILON, G. Malaria pathogenesis. **Science**, v. 264, n. 5167, p. 1878-1883, 1994.

MILLER, L. H. *et al.* The pathogenic basis of malaria. **Nature**, v. 415, n. 6872, p. 673-679, 2002.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de diagnóstico laboratorial da malária, 1ª edição, p.10 e 19, 2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Guia prático de tratamento da malária no Brasil, 1ª edição, p.38, 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Boletim Epidemiológico, v. 44, n. 1 p.1-16, 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Boletim Epidemiológico, v. 46, n. 25 p.1-5, 2015.

MONTOIA, A. Semi-Síntese de derivados de elipticina e atividade antimalárica de isolados e infusão de *Aspidosperma vargasii*. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2013.

MONTOIA, A. *et al.* Antiplasmodial activity of synthetic ellipticine derivatives and an isolated analog. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, n. 12, p. 2631-2634, 2014.

MYAT, P. K. *et al.* Emergence of chloroquine-resistant *Plasmodium vivax* in Myanmar (Burma). **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 87, p. 687-687, 1993.

NAING, C. *et al.* Is *Plasmodium vivax* malaria a severe malaria?: A systematic review and meta-analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 8, p. e3071, 2014.

NEIVA, A. Ueber die Bildung einer chinin resistenten Rasse des Malaria parasiten. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 2: 131-40, 1910.

NOEDL, H. *et al.* Histidine-rich protein II: a novel approach to malaria drug sensitivity testing. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 6, p. 1658-1664, 2002.

NOEDL, H.; WONGSRICHANALAI, C.; WERNSDORFER, W. H. Malaria drug-sensitivity testing: new assays, new perspectives. **Trends in Parasitology**, v. 19, n. 4, p. 175-181, 2003.

NOEDL, H. *et al.* Evidence of artemisinin-resistant malaria in western Cambodia. **New England Journal of Medicine**, v. 359, n. 24, p. 2619-2620, 2008.

NOGUEIRA, F.; ROSÁRIO, V. E. D. Métodos para avaliação da atividade antimalárica nas diferentes fases do ciclo de vida do *Plasmodium*. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 1, n. 3, p. 109-124, 2010.

NOMURA, T. *et al.* Evidence for different mechanisms of chloroquine resistance in 2 *Plasmodium* species that cause human malaria. **Journal of Infectious Diseases**, v. 183, n. 11, p. 1653-1661, 2001.

NOSTEN, F. *et al.* Mefloquine-resistant falciparum malaria on the Thai-Burmese border. **The Lancet** v. 337, p. 1140–1143, 1991.

NOSTEN, F. *et al.* Effects of *Plasmodium vivax* malaria in pregnancy. **The Lancet**, v. 354, n. 9178, p. 546-549, 1999.

NOULIN, F. *et al.* 1912–2012: A century of research on *Plasmodium vivax* *in vitro* culture. **Trends in Parasitology**, v. 29, n. 6, p. 286-294, 2013.

OLIVEIRA-FERREIRA, J. *et al.* Malaria in Brazil: an overview. **Malaria Journal**, v. 9, n. 1, p. 1, 2010.

ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD. Manual para el diagnostico microscopico de la malaria. Publicación Científica, OPAS/OMS, Nº 276, 1975.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. Casos de malária aumentam na região das Américas, OPAS/OMS, 2018.

PAGE, C. P. *et al.* Infecções Parasitárias. Farmacologia Integrada. São Paulo: Manoele, 1999. p.461 - 66. cap. 25.

PARKER, P. D.; TILLEY, L.; KLONIS, N. *Plasmodium falciparum* induces reorganization of host membrane proteins during intraerythrocytic growth. **Blood**, v. 103, n. 6, p. 2404-2406, 2004.

PEREIRA, T. B. Limonoides antimaláricos e nematicida a partir dos resíduos do processo industrial de produção do óleo da Andiroba (*Carapa guianensis*. *Aubl.-Meliaceae*). Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2013.

PEREIRA, T. B. *et al.* *In vitro* and *in vivo* anti-malarial activity of limonoids isolated from the residual seed biomass from *Carapa guianensis* (andiroba) oil production. **Malaria Journal**, v. 13, n. 1, p. 1, 2014.

PETERS, W. Chemotherapy and drug resistance in malaria, 2nd ed. Academic Press, Inc., New York, 1987.

PETERSEN, I.; EASTMAN, R.; LANZER, M. Drug-resistant malaria: Molecular mechanisms and implications for public health. **FEBS Letters**, v. 585, n. 11, p. 1551-1562, 2011.

PHILLIPS, E. J.; KEYSTONE, J. S.; KAIN, K. C. Failure of combined chloroquine and high-dose primaquine therapy for *Plasmodium vivax* malaria acquired in Guyana, South America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 23, n. 5, p. 1171-1173, 1996.

PINTO, A. C. *et al.* New antimalarial and cytotoxic 4-nerolidylcatechol derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 6, p. 2731-2735, 2009.

PIPER, R. *et al.* Immunocapture diagnostic assays for malaria using *Plasmodium* lactate dehydrogenase (pLDH). **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 60, n. 1, p. 109-118, 1999.

POHLIT, A. M. *et al.* LC-ESI-MS determination of quassinoids isobrucein B and neosergeolide in *Picrolemma sprucei* stem infusions. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 6, p. 1065-1070, 2009.

POHLIT, A. M. *et al.* Amazonian plant natural products: perspectives for discovery of new antimalarial drug leads. **Molecules**, v. 18, n. 8, p. 9219-40, 2013.

PRASAD, C.; APARNA, N.; KUMAR, M. H. Exflagellated microgametes of *Plasmodium vivax* in human peripheral blood: an uncommon feature of malaria. **Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion**, v. 27, n. 2, p. 104-106, 2011.

PRATT-RICCIO, L. R. *et al.* Use of a colorimetric (DELI) test for the evaluation of chemoresistance of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* to commonly used anti-plasmodial drugs in the Brazilian Amazon. **Malaria Journal**, v. 12, n. 1, p. 1, 2013.

PRUDÊNCIO, M.; RODRIGUEZ, A.; MOTA, M. M. The silent path to thousands of merozoites: the *Plasmodium* liver stage. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, n. 11, p. 849-856, 2006.

R Development Core Team (2018) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>, version 3.4.3.

RANG, H. P., DALE, M. M. Farmacologia. Drogas Antiprotozoários. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 520 - 27. cap. 37, 1993.

REININGER, L. *et al.* The *Plasmodium falciparum*, Nima-related kinase Pfnek-4: a marker for asexual parasites committed to sexual differentiation. **Malaria Journal**, v. 11, n. 1, p. 1, 2012.

RENAPURKAR, D. *et al.* Micro test for assaying sensitivity of *Plasmodium vivax in vitro*. **Chemotherapy**, v. 35, n. 3, p. 160-163, 1989.

RIECKMANN K. H. *et al.* Effects of chloroquine, quinine, and cycloguanil upon the maturation of asexual erythrocytic forms of two strains of *Plasmodium falciparum in vitro*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 17, n. 5, p. 661-71, 1968.

RIECKMANN K. H. *et al.* Drug Sensitivity of *P. falciparum* an “*in vitro*” microtechnique. **The Lancet**, v. 7, p. 22-23, 1978.

RIECKMANN, K.; DAVIS, D.; HUTTON, D. *Plasmodium vivax* resistance to chloroquine? **The Lancet**, v. 334, n. 8673, p. 1183-1184, 1989.

ROCHA, L. F. S. Susceptibilidade *in vitro* de isolados de campo de *Plasmodium falciparum* à infusão (chá) de *Artemisia annua* cultivada na região amazônica. Dissertação (Mestrado em Doenças Tropicais e Infecciosas) – Universidade do Estado do Amazonas, 2009.

ROCHA E SILVA, L. F. *et al.* *In Vivo* and *In Vitro* Antimalarial Activity of 4-Nerolidylcatechol. **Phytotherapy Research**, v. 25, n. 8, p. 1181-1188, 2011.

ROCHA E SILVA, L. F. *et al.* Comparative *in vitro* and *in vivo* antimalarial activity of the indole alkaloids ellipticine, olivacine, cryptolepine and a synthetic cryptolepine analog. **Phytomedicine**, v. 20, n. 1, p. 71-76, 2012a.

ROCHA E SILVA, L. F. *et al.* *In vitro* susceptibility of *Plasmodium falciparum* Welch field isolates to infusions prepared from *Artemisia annua* L. cultivated in the Brazilian Amazon. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 7, p. 859-866, 2012b.

ROCHA E SILVA, L. F. *et al.* *In vivo* antimalarial activity and mechanisms of action of 4-nerolidylcatechol derivatives. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 6, p. 3271-3280, 2015.

ROOBSOONG, W. *et al.* Improvement of culture conditions for long-term *in vitro* culture of *Plasmodium vivax*. **Malaria Journal**, v. 14, p. 297, 2015.

RUSSELL, B. *et al.* Determinants of *in vitro* drug susceptibility testing of *Plasmodium vivax*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 3, p. 1040-1045, 2008.

RUSSELL, B. *et al.* A reliable *ex vivo* invasion assay of human reticulocytes by *Plasmodium vivax*. **Blood**, v. 118, p. 74–81, 2011.

SAITO-ITO, A. *et al.* A rapid, simple and sensitive flow cytometric system for detection of *Plasmodium falciparum*. **Parasitology International**, v. 50, n. 4, p. 249-257, 2001.

SANCHEZ *et al.* Validation of a *Plasmodium falciparum* parasite transformed with green fluorescent protein for antimalarial drug screening, **Journal of Microbiological Methods**, v.69, n.3, p. 518-522, jun, 2007.

SANTANA FILHO, F. S. *et al.* Chloroquine-resistant *Plasmodium vivax*, Brazilian Amazon. **Emerging Infectious Diseases**, v.13, n. 7, p. 1125-6. Jul, 2007.

SANTOS-TORRES, Z. E. *et al.* Chemical composition of *Aspidosperma* Markgr and antiplasmodial activity of selected indole alkaloids. **Molecules**, v. 18, v. 6, p. 6281-97, 2013.

SCHERF, A.; LOPEZ-RUBIO, J. J.; RIVIERE, L. Antigenic variation in *Plasmodium falciparum*. **Annual Review Microbiology**, v. 62, p. 445-470, 2008.

SCHLESINGER, P. H.; KROGSTAD, D. J.; HERWALDT, B. L. Antimalarial agents: mechanisms of action. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 32, n. 6, p. 793, 1988.

SCHUSTER, F. L. Cultivation of *Plasmodium* spp. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 3, p. 355-364, 2002.

SCHUURKAMP, G. J. *et al.* Chloroquine-resistant *Plasmodium vivax* in Papua New Guinea. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 86, n. 2, p. 121-122, 1992.

SCHWARTZ, I. K.; LACKRITZ, E. M.; PATCHEN, L. C. Chloroquine-resistant *Plasmodium vivax* from Indonesia. **New England Journal of Medicine**, v. 324, n. 13, p. 927, 1991.

SILVA, M. F.; LISBOA, P. L. B.; LISBÔA, R. C. L. Nomes vulgares de plantas amazônicas. 1977.

SILVA, E. C. *et al.* Biological activity of neosergeolide and isobrucein B (and two semi-synthetic derivatives) isolated from the Amazonian medicinal plant *Picrolemma sprucei* (Simaroubaceae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 1, p. 48-56, 2009.

SILVA, J. R. *et al.* A review of antimalarial plants used in traditional medicine in communities in Portuguese-speaking countries: Brazil, Mozambique, Cape Verde, Guinea-Bissau, Sao Tome and Principe and Angola. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106 Suppl 1, p. 142-58, Aug 2011.

SILVESTRINI, F.; ALANO, P.; WILLIAMS, J. Commitment to the production of male and female gametocytes in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Parasitology**, v. 121, n. 05, p. 465-471, 2000.

SINDEN, R.; ALAVI, Y.; RAINE, J. Mosquito–malaria interactions: a reappraisal of the concepts of susceptibility and refractoriness. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 34, n. 7, p. 625-629, 2004.

SINNIS, P.; ZAVALA, F. The skin stage of malaria infection: biology and relevance to the malaria vaccine effort. 2008.

SIVEP-MALÁRIA, Resumo epidemiológico Nacional Mensal. Disponível em: <<http://dw.saude.gov.br/gsid/servlet/mstrWeb?evt=2048001&documentID=AC2B0F5041CEEC8C671FA39D5337A697&server=srvbipdf03&project=DMMalaria&uid=convitado&pwd=datusus&hiddensections=header,path,dockTop,dockLeft,footer>>. Acesso em: 15 fev 2018.

SOMÉ, A. F. *et al.* Selection of drug resistance-mediating *Plasmodium falciparum* genetic polymorphisms by seasonal malaria chemoprevention in Burkina Faso. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 7, p. 3660-3665, 2014.

SRIPRAWAT, K. *et al.* Effective and cheap removal of leukocytes and platelets from *Plasmodium vivax* infected blood. **Malaria Journal**, v. 8, p. 115, 2009.

STURM, A. *et al.* Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. **Science**, v. 313, n. 5791, p. 1287-1290, 2007.

SUWANARUSK, R. *et al.* Amplification of *pvm-dr1* associated with multidrug-resistant *Plasmodium vivax*. **Journal of Infectious Diseases**, v. 198, n. 10, p. 1558-1564, 2008.

SUWANARUSK, R. *et al.* Chloroquine resistant *Plasmodium vivax*: *in vitro* characterisation and association with molecular polymorphisms. **PLoS One**, v. 2, n. 10, p. e1089, 2007.

TADEI, W. P.; DUTARY THATCHER, B. Malaria vectors in the Brazilian Amazon: *Anopheles* of the subgenus Nyssorhynchus. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 42, n. 2, p. 87-94, 2000.

TALISUNA, A. O.; BLOLAND, P.; D'ALESSANDRO, U. History, dynamics, and public health importance of malaria parasite resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, n. 1, p. 235-254, 2004.

TASANOR, O. *et al.* An *in vitro* system for assessing the sensitivity of *Plasmodium vivax* to chloroquine, **Acta Tropica**, v. 83, p. 49–61. 2002.

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

THOME, R. *et al.* Chloroquine: modes of action of an undervalued drug. **Immunol Lett**, v.153, n. 1-2, p. 50-7, 2013.

TOURÉ-NDUO F. S. *et al.* Relationship between *in vivo* synchronicity of *Plasmodium falciparum* and allelic diversity. **Parasitology International**, v. 58, n. 4, p. 390–3, 2012.

TRACY, J.W.; WEBSTER, Jr., L.T. Fármacos usados no tratamento das protozooses. Malária. In: *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. Goodman e Gilman (eds). Rio de Janeiro. 40: 709-40, 1996.

TRAGER, W.; JENSEN, J. B. Human malaria parasites in continuous culture. **Science**, v. 193, n. 4254, p. 673-675, 1976.

UDOMSANGPETCH, R. *et al.* Short-term *in vitro* culture of field isolates of *Plasmodium vivax* using umbilical cord blood. **Parasitology International**, v. 56, p. 65–69, 2007.

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

VAN DEN ABBEELE, K.; VAN DEN ENDEN, E.; VAN DEN ENDE, J. Combined chloroquine and primaquine resistant *Plasmodium vivax* malaria in a patient returning from India. **Annales de la Société Belge de Médecine Tropicale**, p. 73-74, 1995.

VERONESI, Ricardo; FOCACCIA, Roberto. Tratado de Infectologia. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2009.

WAHLGREN, M.; TREUTIGER, C.; GYSIN, J. Cytoadherence and resetting in the pathogenesis of severe malaria. Malaria molecular and clinical aspects, 1a ed. Amsterdam: Editorial Harwood Academic Publishers, p. 289-327, 1999.

WEATHERALL, D. J. *et al.* Malaria and the red cell. **ASH Education Program Book**, v. 2002, n. 1, p. 35-57, 2002.

WERNSDORFER, W.H. e PAYNE, D. Drug sensitivity test in malaria parasites. **Malaria Principles and Practice of Malariology**. Wernsdorfer, W.H e McGregor, I.A (eds) Churchill Livingstone, Edinburgh, n.2, p. 1765-1800, 1988.

WIRJANATA *et al.* Quantification of *Plasmodium* ex vivo drug susceptibility by flow cytometry, **Malaria Journal**, v. 14, p. 417, 2015.

WHITE N.: Quinghaosu (Artemisinin): The price of success. **Science**, v. 320, p. 330-4, 2008.

WHITE, N. J. Determinants of relapse periodicity in *Plasmodium vivax* malaria. **Malaria Journal**, v. 10, n. 1, p. 1, 2011.

WHO. **World Health Organization**. Chemotherapy of malaria and resistance to antimalarials. Report of a WHO Scientific Group. Technical Report Series N° 529. Geneva, 1973.

WHO. **World Health Organization**. Drug resistance in malaria. WHO/CDS/CSR/DRS/2001.

WHO. **World Health Organization**. Guidelines for the treatment of Malaria. WHO, 2006.

WHO. **World Health Organization**. Field application of *in vitro* assays for the sensitivity of human malaria parasites to antimalarial drugs. Library Cataloguing-in-Publication Data, Geneva. 2007.

WHO. **World Health Organization**, Geneva. 2014.

WHO. **World Health Organization**, Geneva. 2015.

WHO. **World Health Organization**, Geneva. 2017.

YOUNG, M.D.; BURGESS, R. W. Pyrimethamine resistance in *Plasmodium vivax* malaria. **Bull World Health Organ**, v. 20, n. 1, p. 27-36, 1959.

YOUNG, M.D.; MOORE, D.V. Chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 10, p. 317-20, 1961.

ZUKERMAN-SCHPECTOR, J. *et al.* A new quassinoid isolated from *Picrolemma pseudocoffea*. **Acta Crystallographica Section C: Crystal Structure Communications**, v. 50, n. 5, p. 794-797, 1994.

ANEXO 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - TCLE

Instituições: Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HDV), Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA)

Pesquisador Principal: Luiz Francisco Rocha e Silva, MsC.

Endereço: Laboratório de Cultura – Gerência de Malária – FMT-HDV. Avenida Pedro Teixeira, 25 – Dom Pedro I – Manaus - AM – CEP 69045-900.

Telefone: (92) 2127 – 3443 / (92)8121 – 5022

Você está sendo convidado(a) a participar deste estudo intitulado: “ATIVIDADE ANTIMALÁRICA IN VITRO E IN VIVO E MECANISMO DE AÇÃO DE COMPOSTOS NATURAIS, SINTÉTICOS E SEMISSINTÉTICOS”, porque você tem perfil e preenche os critérios para, na condição de sujeito, participar desta pesquisa. Sujeito da Pesquisa é a expressão dada a todo ser humano que, de livre e espontânea vontade e após ser devidamente esclarecido, concorda em participar de pesquisa, doando material biológico, se submetendo a variados procedimentos invasivos ou não, ou ainda fornecendo informações. O objetivo deste estudo é identificar novas drogas para o tratamento da malária a partir de plantas da região amazônica. Sua participação será apenas para doar sangue antes do início do seu tratamento. O tratamento será igual ao normalmente usado para casos desse tipo. Os resultados desse estudo não lhe beneficiarão diretamente, mas poderão, no futuro, beneficiar outras pessoas com malária. O procedimento será o seguinte: um volume de 5mL de sangue será coletado da veia do antebraço com agulha e seringa (punção), podendo, em algum outro momento da pesquisa, você ser solicitado para uma nova coleta de sangue. A retirada do seu sangue poderá ser feita, por Bioquímico ou técnico de saúde da equipe de investigadores. Os possíveis desconfortos e riscos, se ocorrerem, são aqueles relacionados com a retirada de sangue, como dor local e/ou hematoma (“rouxidão”) no local da punção, com duração de 3 a 4 dias. Todos os cuidados apropriados serão tomados, como uso de seringa, agulha e gaze descartável assim como álcool para limpeza local, entre outros. Quanto aos procedimentos de coleta não foram identificados riscos até o momento. Todo o material coletado e estocado (sangue com o parasito da malária) assim como dados pessoais e epidemiológicos serão utilizados neste projeto, podendo vir a serem utilizados também em pesquisas futuras, desde que o projeto seja aprovado por Comitê de Ética, porém sempre resguardando a sua privacidade. As amostras biológicas e os dados do questionário ficarão sob responsabilidade do Laboratório de Cultura – Gerência de Malária – FMT-HDV. Os resultados desse e de estudos futuros serão relatados à sua pessoa e considerados confidenciais, podendo ser divulgados na forma de comunicação científica. Entretanto, não será permitida a sua identificação, o que garante a sua privacidade. Você terá toda autonomia para decidir entrar ou não na pesquisa. Também, você terá toda liberdade para se retirar do estudo a qualquer momento, sem prejuízo de qualquer natureza. Sempre que for necessário esclarecer alguma dúvida sobre o estudo, você deverá buscar contato com o coordenador da pesquisa Luiz Francisco Rocha e Silva, no endereço e telefone relacionados acima. Para quaisquer informações, fica disponibilizado o endereço do CEP/FMT-HVD, sito à Av. Pedro Teixeira nº 25 – Dom Pedro, CEP 69.040-000, Manaus-AM, que funciona de 2ª a 6ª Feira, das 08:00 às 14:00 horas, telefone (92)21273572, e-mail: cep@fmt.am.gov.br.

C O N S E N T I M E N T O

Li, tomei conhecimento, entendi os aspectos da pesquisa e, voluntariamente, concordo em participar do estudo.

Assinatura (Sujeito da Pesquisa); _____

RG: _____ Endereço: _____

Pesquisador: _____

Data: _____

ANEXO 2

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA
DOURADO ((FMT-HVD))



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ATIVIDADE ANTIMLÁRICA IN VITRO E IN VIVO E MECANISMO DE AÇÃO DE COMPOSTOS NATURAIS, SINTÉTICOS E SEMISSINTÉTICOS - AANTIMALC - NSS

Pesquisador: Luíz Francisco Rocha e Silva

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 14496913.9.0000.0005

Instituição Proponente: Diretoria de Ensino e Pesquisa - DENPE

Patrocinador Principal: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas - FAPEAM

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 339.265

Data da Relatoria: 12/07/2013

Apresentação do Projeto:

Trata-se do Projeto de Pesquisa ATIVIDADE ANTIMLÁRICA IN VITRO E IN VIVO E MECANISMO DE AÇÃO DE COMPOSTOS NATURAIS, SINTÉTICOS E SEMISSINTÉTICOS - AANTIMALC - NSS de responsabilidade do Pesquisador: `Luiz Francisco Rocha e Silva submetido a FAPEAM através do Edital /Universal/2013. Desenho Epidemiológico: Estudo descritivo experimental

A malária é considerada um grave problema de saúde pública mundial inclusive na região Amazônica. A emergência da resistência do Plasmodium às tradicionais impulsiona a busca de novas drogas para o tratamento da doença. Os produtos naturais tem se mostrado fontes promissoras de compostos antimaláricos e a Amazônia como um dos maiores biomas do planeta oferece um vasto campo de estudo novos fármacos. O objetivo da presente proposta é avaliar a atividade antimalárica in vitro e in vivo de produtos naturais, substâncias sintéticas e derivados semissintéticos, e propor mecanismos de ação antimaláricos para estas substâncias. Serão estudadas substâncias presentes em plantas amazônicas como 4-Nerolidilcatecol e seus derivados, elipticina e olivacina, além de outros compostos isolados e produzidos pelo grupo

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25

Bairro: D. Pedro I

CEP: 69.040-000

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)2127-3572

Fax: (92)2127-3572

E-mail: cep@fmt.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA
DOURADO ((FMT-HVD))



de química de produtos naturais da CPPN-INPA. Estes compostos serão avaliados para sua atividade antimalárica in vitro frente as formas sanguíneas de *P. falciparum* e *P. vivax*. Os compostos que apresentarem atividade in vitro terão sua eficácia terapêutica avaliada in vivo em camundongos infectados com *P. berghei*. Os compostos que apresentarem resultados promissores serão estudados quanto ao seu possível mecanismo de ação em alvos moleculares do Plasmodium como a via de biossíntese de terpenos e a via de polimerização do heme. Espera-se ao final do projeto caracterizar a ação farmacológica e anti-parasitária de compostos presentes em plantas amazônicas, e propor possíveis mecanismos de ação antimalárico para estes compostos, indicando novos protótipos para drogas antimaláricas. Pretende-se também estabelecer um laboratório para realização sistemática de testes antimaláricos para triagem de novas drogas.

Metodologia Proposta: 9.2.1 Cultivo de Plasmodium falciparum; Para o estudo in vitro serão utilizadas duas cepas de *P. falciparum*,: a cepa cloroquino-resistente K1, e a cepa cloroquino-sensível 3D7. O método de cultivo in vitro de *P. falciparum* utilizado será uma modificação da técnica de (Trager e Jensen, 1976) adaptada pelo laboratório de malária da Fundação de Medicina Tropical.

9.2.2 Obtenção de isolados de campo de *P. falciparum* e *P. vivax*: Serão coletadas e analisadas amostras clínicas de pacientes infectados por *P. vivax* (30 amostras) e *P. falciparum*

(10 amostras) diagnosticados pela gota espessa corada pelo método descrito por Walker (OPS/OMS, 1975), que demandarem da rotina de malária da Fundação de Medicina Tropical de Heitor Vieira Dourado. 9.2.2.1 Coleta de sangue: De cada paciente serão coletados 5 ml de sangue venoso em tubos vacutainer® com anticoagulante (heparina ou ACD), para os estudos de susceptibilidade às drogas e duas gotas da amostra em papel-filtro para as análises futuras de marcadores moleculares de resistência.

3.4 Densidade Parasitária: Será determinada utilizando-se a lâmina corada com o kit Panótico Rápido (Laborclin), onde os parasitas são contados contra 100 células brancas e as densidades

convertidas a parasitas/mm³ pela referência da contagem global de leucócitos, estipulado numa de média de 5.000/uL.

9.2.3 Microteste de atividade antimalárica in vitro com *P. falciparum*; As substâncias a serem testadas serão solubilizadas em solventes de modo a obter uma concentração mãe a 5 mg/mL e posteriormente diluídas em sete concentrações para serem testadas in vitro. O microteste será realizado segundo metodologia descrita por (Rieckmann, Campbell et al., 1978), com

Endereço:	Av. Pedro Teixeira, 25		
Bairro:	D. Pedro I	CEP:	69.040-000
UF:	AM	Município:	MANAUS
Telefone:	(92)2127-3572	Fax:	(92)2127-3572
		E-mail:	cep@fmt.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA
DOURADO ((FMT-HVD))



modificações descritas por Andrade-Neto et al. (2007). Para os ensaios com *P. falciparum*, a detecção da atividade inibitória dos compostos poderá ser por contagem

microscópica utilizada para as cepas padrão e 10% dos isolados de campo, ou pelo ELISA-sanduiche com detecção da Lactato-Desidrogenase de *P. Falciparum* (pLDH). 9.2.3 Microteste de atividade antimalárica in vitro com *P. vivax*; O método para avaliação da sensibilidade do plasmódio às substâncias será o DELIteste, método imunoenzimático ELISAsanduiche,

baseado na detecção da enzima Lactato Desidrogenase plasmodial (pLDH), como descrito DRUILHE et al, 2007. Os isolados serão testados para cloroquina, mefloquina, derivado de artemisinina e frente a seis moléculas naturais isoladas de plantas amazônicas. Para as culturas será considerando o percentual de perda de 50%. Para o estudo in vitro com *P. vivax* serão utilizados 30 isolados de campo obtidos de pacientes sintomáticos com malária vivax. As substâncias a serem testadas serão solubilizadas em solventes de modo a obter uma concentração mãe a 5 mg/mL e posteriormente diluídas em sete concentrações em microplaca de 96 poços. O sangue infectado com *P. vivax* será centrifugado e lavado com meio de cultura RPMI, sendo posteriormente preparada uma suspensão de hemácias parasitadas com meio de cultura RPMI enriquecido com plasma humano e meio Wimouth. As hemácias parasitadas serão dispensadas na microplaca com as diluições das substâncias. As placas serão incubadas por 48 horas á 37 °C e baixa tensão de oxigênio. 9.2.3.3 Análise dos resultados Os valores de densidade óptica produzidos por cada poço da placa de ELISA corresponderão à concentração da proteína pLDH encontrada nas amostras de cultura apos 48h de incubação, e representam indicadores consistentes de crescimento de parasita. As concentrações inibitórias individuais de crescimento do parasito (IC50%, IC90%, IC99%) para todos os ensaios serão determinadas através de uma análise de regressão não linear.

O software usado será baseado em um modelo de regressão polinomial e é de domínio público na internet(disponível em <http://malaria.farch.rede>).

9.2.4 Testes de atividade antimalárica in vivo com *P. berghei*; Será utilizada para avaliar a atividade antimalárica in vivo a cepa de *Plasmodium berghei* NK

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar a atividade antimalárica in vitro em *P. falciparum* e *P. vivax*, e in vivo em *P. berghei* de compostos naturais amazônicos, semissintéticos e sintéticos, e propor possíveis mecanismos de ação para as substâncias ativas.

Endereço:	Av. Pedro Teixeira, 25		
Bairro:	D. Pedro I	CEP:	69.040-000
UF:	AM	Município:	MANAUS
Telefone:	(92)2127-3572	Fax:	(92)2127-3572
		E-mail:	cep@fmt.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA
DOURADO ((FMT-HVD))



Objetivo Secundário:

- Avaliar a atividade antimalárica in vitro de compostos naturais, sintéticos e semissintéticos frente a cepas isolados de campo de *P. falciparum*, estabelecendo IC50 dos compostos ativos.
- Adaptar protocolos de testes de atividade antimalárica in vitro com *P. vivax*.
- Avaliar a eficácia terapêutica dos compostos bioativos in vitro em modelos de malária murina in vivo.
- Avaliar a capacidade inibitória dos compostos alvo sobre a inibição da produção de hemozoína em *P. falciparum*, propondo assim um possível mecanismo de ação.
- Avaliar a capacidade inibitória dos compostos alvo sobre a inibição da via metabólica de biossíntese de isopenóides em *P. falciparum*, propondo assim um possível mecanismo de ação.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Não haverá riscos ao paciente exceto os possíveis riscos associados a coleta venosa do sangue, os quais são minimizados pela experiência e qualificação do profissional que realizará a coleta (um técnico de patologia clínica).

Benefícios:

Não há benefícios diretos ao paciente. Os benefícios do projeto estão relacionados a futuras descobertas de novos antimaláricos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de pesquisa factível e de grande relevância para a sociedade, que pretende testar a atividade antimalárica in vivo e in vitro de produtos naturais, substâncias sintéticas e derivados semissintéticos, e propor mecanismos de ação antimaláricos para estas substâncias.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O presente projeto apresentou todos os itens de obrigatoriedade, de acordo com a Resolução do CNS 196/96.

Endereço:	Av. Pedro Teixeira, 25		
Bairro:	D. Pedro I	CEP:	69.040-000
UF:	AM	Município:	MANAUS
Telefone:	(92)2127-3572	Fax:	(92)2127-3572
		E-mail:	cep@fmt.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA
DOURADO ((FMT-HVD))



Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A apreciação anterior, apontou como pendência a apresentação da Carta de Anuência do órgão pertencente a Instituição responsável pelo grupo de química de produtos naturais ,produtor dos insumos a serem testados. resposta do Pesquisador:

A Carta de Anuência foi devidamente anexada.

Conclusão: Pendência atendida.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O presente projeto está APROVADO (Ad referendum) e os interessados ficam informados de apresentar a este CEP os relatórios parciais e final do estudo, conforme prevê a Resolução CNS nº 446/12 dezembro de 2012, item XI.2, "d", utilizando o formulário de Roteiro para Relatório Parcial/Final de estudos clínicos Unicêntricos e Multicêntricos, proposto pela CONEP em nossa home page.

MANAUS, 23 de Julho de 2013

Assinador por:

Marilaine Martins

(Coordenador)

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25

Bairro: D. Pedro I

CEP: 69.040-000

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)2127-3572

Fax: (92)2127-3572

E-mail: cep@fmt.am.gov.br