Rodrigo Antonio Ceschini Sussmann

Estudo da função de vitamina E e da biossíntese de vitamina K1 em *Plasmodium falciparum*

Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, Programa de Pós-Graduação da Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo 2015

Rodrigo Antonio Ceschini Sussmann

Estudo da função de vitamina E e da biossíntese de vitamina K1 em *Plasmodium falciparum*

Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro.

Orientador: Prof. Dr. Alejandro Miguel Katzin

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP) Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Sussmann, Rodrigo Antonio Ceschini.

Estudo da função da vitamina E e da biossíntese de vitamina K1 em *Plasmodium falciparum* / Rodrigo Antonio Ceschini Sussmann. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Prof. Dr. Alejandro Miguel Katzin.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Parasitologia. Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. Linha de pesquisa: Protozoologia de parasitas.

Versão do título para o inglês: Study of vitamin E funcition and vitamin K1 biosynthesis in *Plasmodium falciparum*.

1. Malaria 2. *Plasmodium falciparum* 3. Sistema redox 4. Vitamina E 5. Vitamina K1 6. Antimaláricos I. Katzin, Prof. Dr. Alejandro Miguel II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro III. Título.

ICB/SBIB0120/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a):	Rodrigo Antonio Ceschini Sussmann.		
Título da Tese:	Estudo da função da vitamina E e da biossíntese de vitamina K1 em <i>Plasmodium falciparum</i> .		
Orientador(a):	Prof. Dr. Alejandro Miguel Katzin.		
A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a////			
()Apro	ovado(a) () Reprovado(a)		

Examinador(a):	Assinatura: Nome: Instituição:
Examinador(a):	Assinatura: Nome: Instituição:
Examinador(a):	Assinatura: Nome: Instituição:
Examinador(a):	Assinatura: Nome: Instituição:
Presidente:	Assinatura: Nome: Instituição:

PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil Telefone :(55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8405 e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 468/11 referente ao projeto intitulado: "*Estudo da distribuição e da função da vitamina E biossintetizada por Plasmodium falciparum*" sob a responsabilidade de Rodrigo Antonio Ceschini Sussmann, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSH- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP n°196 de 1996.

São Paulo, 17 de agosto de 2011.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF DR. PAOLO M.A ZANOTTO Coordenador da CEPsh - ICB/USP

AGRADECIMENTOS

Ao Alejandro pelo exemplo de profissionalismo em pesquisa. Por ter dado a oportunidade de desenvolvimento desse trabalho e transmitido seu conhecimento.

À Emília por sua contribuição fundamental em discussões, pela sua paciência em revisar textos e pela sua sinceridade.

À Valnice pela sua competência em manter o laboratório operante e pela pessoa maravilhosa que é.

Ao José Mario pela ajuda em experimentos, por revisar textos e pela amizade.

Aos colegas de laboratório Fabiana, Heloísa, Alexandre, Danielle, Raquel, Alejandra e Márcia pela amizade e companheirismo nas discussões e experimentos realizados nesses últimos quatro anos.

Aos professores do Departamento de Parasitologia que abriram as portas de seus laboratórios e não mediram esforços para solucionar problemas.

Aos colegas do Departamento de Parasitologia, alunos e funcionários pela amizade.

Aos professores e colegas do Instituto de Química da USP e da Universidade de Rosário - Argentina pelo apoio metodológico.

À Tânia, a minha amante, namorada, noiva e esposa por estar ao meu lado em todos os momentos e me mostrar o verdadeiro amor.

Aos meus filhos Ana e Gabriel, à minha irmã Tatiana, aos meus sobrinhos Isabele, Enzo e Artur e demais familiares por fazerem parte de minha vida, pelo amor e pelo companheirismo.

Aos meus pais, Stezel e Sandra, pela criação e educação que me transmitiram, pelas oportunidades que me deram, pela amizade e pelo apoio em minhas decisões.

Este trabalho contou com o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e do Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq).

PREFÁCIO

"Esta tese foi elaborada de acordo com as normas da GPG/ICB, relativas a outras formas de elaboração de tese de doutoramento, que permitem a inclusão dos anexos cujos resultados já foram publicados ou submetidos em periódicos internacionais indexados em língua inglesa. Permitem ainda, que detalhes metodológicos e resultados sejam aqueles contidos nos artigos anexados no corpo da tese."

Anexos que compõem o corpo desta tese:

- Anexo I *In vivo* antimalarial activity and mechanisms of action of 4-nerolidylcatechol derivatives. (Antimicrobial Agents Chemotherapy. 59:3271–3280, 2015).
- Anexo II Quantification of nerolidol in mouse plasma using gas chromatography-mass spectrometry. (Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 111:100– 103, 2015).
- Anexo III Stabilization and detection of hydrophylloquinone as di-O-methyl derivative. (Journal of Chromatography B, submitted).

RESUMO

Sussmann, RAC. Estudo da função da vitamina E e da biossíntese de vitamina K1 em *Plasmodium falciparum* [tese (Doutorado em Parasitologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2015.

Dentre as doenças infecciosas que acometem o homem, a malária apresenta o maior índice de mortalidade com mais de 500 mil mortes registradas em 2013. Para agravar a situação de saúde pública, foi descrito o surgimento de resistência às drogas usadas na terapêutica da doença. Torna-se necessário a identificação e o estudo de novos alvos antimaláricos. A via MEP se mostra como um potencial alvo para o desenvolvimento de drogas contra P. falciparum uma vez que está ausente em humanos. A fim de aprofundar o conhecimento dessa via no parasita, nossos objetivos foram avaliar a função da vitamina E biossintetizada pelo parasita e caracterizar a biossíntese de vitamina K1 e o metabolismo de fitol. Esse estudo determinou que a vitamina E biossintetizada pelo parasita atua no sistema redox do parasita, empregando análises por citometria de fluxo com sondas sensíveis ao estresse oxidativo. Caracterizamos por técnicas cromatográficas (RP-HPLC e GC) e/ou de espectrometria de massas do produto da oxidação do tocoferol. Por outro lado, empregando marcações metabólicas com precursores radioativos, mostramos que a biossíntese de vitamina K1 é ativa no parasita e detectamos sua forma reduzida: a hidrofiloquinona. Por fim, utilizando marcações metabólicas e análises por RP-HPLC, observamos que existe uma via de reaproveitamento de fitol em P. falciparum assim como em plantas, uma vez que esse composto é fosforilado e usado para a biossíntese das vitaminas E e K1. O estudo abre oportunidades para um desenvolvimento racional de novos antimaláricos e aprofunda o conhecimento na biologia do parasita.

Palavras chave: Malária. *Plasmodium falciparum*. Sistema redox. Vitamina E. Vitamina K1. Antimaláricos.

ABSTRACT

Sussmann, RAC. Estudy of vitamin E function and of vitamin K1 biosynthesis in *Plasmodium falciparum* [Ph. D. Thesis (Parasitology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2015.

Among the infectious diseases that affect humans, malaria has the highest mortality rate with more than 500 000 deaths in 2013. The public health situation gets worsen because it has been described the emergence of resistance to common drugs used in the treatment of disease. It is necessary to identify and study of new antimalarial targets. The MEP pathway is a potential target for drug development against *Plasmodium falciparum* once it is absent in humans. In order to deepen the understanding of this pathway in the parasite, our objectives were to evaluate the function of vitamin E biosynthesized by the parasite and characterize the biosynthesis of vitamin K1 and the phytol metabolism. This study determined that vitamin E biosynthesized by the parasite operates in the redox system of the parasite using flow cytometric analysis with susceptible probes to oxidative stress. We characterize by chromatographic techniques (RP-HPLC and GC) and/or mass spectrometry the oxidation product of tocopherol. On the other hand, employing metabolic labeling with radioactive precursors, we show the biosynthesis of vitamin K1 is active on parasite and we detected its reduced form: the hidrophylloquinone. Finally, using metabolic labeling with radioactive precursors and RP-HPLC analysis, we demonstrate that there is a phytol salvage pathway in P. falciparum as well as plants, since this compound is phosphorylated and used for the biosynthesis of vitamins E and K1. The study opens opportunities for the rational development of new antimalarials and deepens knowledge on parasite biology.

Keywords: Malaria. *Plasmodium falciparum*. Redox system. Vitamin E. Vitamin K1. Antimalarials.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Ciclo de vida de plasmódios humanos17
Figura 2- Casos confirmados de malaria em 201319
Figura 3- Casos confirmados de malaria no Brasil em 201320
Figura 4- Emergência de resistência aos antimaláricos23
Figura 5- Estrutura das moléculas de IPP e DMAPP25
Figura 6- Via MEP27
Figura 7- Via de biossíntese para as vitaminas E e K129
Figura 8- Esquema da via de reaproveitamento de fitol em Arabidopsis thaliana30
Figura 9- Caracterização por GC/MS de tocoferolquinona
Figura 10- Perfil de incorporação radioativa em situação de estresse oxidativo I46
Figura 11- Concentração inibitória de 50% de crescimento da cercosporina47
Figura 12- Perfil de incorporação radioativa em situação de estresse oxidativo II48
Figura 13- Avaliação por imagem do CellRox49
Figura 14- Avaliação por imagem do Image-it50
Figura 15- Dot Plot dos parâmetros utilizados na análise com CelLRox51
Figura 16- Níveis de estresse oxidativo em <i>P. falciparum</i>
Figura 17- Níveis de estresse oxidativo em eritrócitos infectados por P. falciparum53
Figura 18- Perfil de incorporação radioativa de [³ H]fitil-PP em <i>P. falciparum</i> 54
Figura 19- Detecção da estrutura química da filoquinona por espectrometria de Massas
Figura 20- Perfil de incorporação radioativa [³ H]GGPP em <i>P. falciparum</i> 57
Figura 21- Análise de espectrometria de massas de fitil-PP58
Figura 22- Perfil de incorporação radioativa de [³ H]fitil-PP em <i>P. falciparum</i> 60
Figura 23- Perfil de incorporação radioativa de [³ H]fitol em <i>P. falciparum</i> 63
Figura 24- Análise por LC-MSMS de fitol64
Figura 25- Análise por GC-MSMS dos isômeros de fitol65
Figura 26- Autoradiografia de extratos totais de <i>P. falciparum</i>

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α-СЕНС	2,5,7,8-tetrametil-2-(29-carboxietil)-6-hidroxicromanol
a.C.	Antes de Cristo
AMI	Amazon Malaria Initiative
ANOVA	Analysis of Variance
APCI	Atmospheric-Pressure Chemical Ionization
ATP	Trifosfato de Adenosina
BHT	Hidroxitolueno Butilado
CA	Califórnia
cDNA	DNA Complementar
CDP-ME	4-(citidina-5-difosfo)-2C-metil-D-eritritol
CDP-MEP	4-(citidina-5-difosfo)-2C-metil-D-eritritol-2-fosfato
Ci	Curie (1 Ci = 3.7×10^{10} desintegrações/segundo)
СМК	4-(citidina-5-difosfo)-2C-metil-D-eritritol quinase
cpm	Contagens por minuto
ĊTP	Trifosfato de Citidina
CumOOH	Hidroperóxido de Cumeno
Da	Dalton
DAD	Detector de Arranjo de Diodo
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DDT	Dithiothreitol
DDT	1,1,1-tricloro-2,2-bis(4-clorofenil)etano
DMAPP	Pirofosfato de Dimetilalila
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOXP	1-deoxi-D-xilulose 5-fosfato
DXR	1-deoxi-D-xilulose 5-fosfato redutoisomerase
DXS	1-deoxi-D-xilulose 5-fosfato sintase
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
EI	Electron Impact
ESI	Eletrospray Ionization
eV	Elétron-volt
Fitil-PP	Pirofosfato de Fitila
FP	Ferriprotoporfirina IX
FPP	Pirofosfato de Farnesila
GC/MS	Gas chromatography-mass spectrometry
GcpE	Hidroximetilbutenil difosfato sintase
GGPP	Pirofosfato de Geranilgeranila
GPP	Pirofosfato de Geranila
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazineetanosulfônico
HMBPP	1-hidroxi-2-metil-2-(E)-butenil 4-difosfato
HMG	3-hidroxi-metil-glutaril
HMG-CoA	3-hidroxi-metil-glutaril-CoA
HMG-R	3-hidroxi-metil-glutaril-CoA-redutase
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IC ₅₀	Concentração inibitória de 50% de crescimento
IPP	Pirofosfato de Isopentenila

LytB	Hidroximetilbutenil difosfato redutase
MCS	2C-metil-D-eritritol-2,4-ciclodifosfato sintase
MCT	2C-metil-D-eritritol-4-fosfato citidina transferase
MEcPP	2C-metil-D-eritritol-2,4-ciclodifosfato
MEP	2C-metil-D-eritritol-4-fosfato
MIM	Multilateral Iniciative on Malaria
min	Minuto(s)
MS	Mass Spectrometry
MS/MS	Tandem Mass Spectrometry
MVA	Ácido Mevalônico ou Mevalonato
NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Phosphate Buffered Saline
PEP	Fosfoenilpiruvato
PNCM	Programa Nacional de Controle da Malária
PTFE	Politetrafluoroetileno
Q-TOF	Quadrupole Time of Flight Mass Spectrometer
RAVREDA	Vigilância de Resistência às Drogas Antimaláricas
RBM	Roll Back Malaria
Rf	Retention Factor
RF	Radio Frequency
RNA	Ácido Ribonucléico
RP-HPLC	Reversed phase - High Performance Liquid Chromatography
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (meio de cultura)
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
ТС	Tocoferol Ciclase
TLC	Thin Layer Chromatography
USA	United States of America
UV	Ultra Violeta
V	Volts
VKOR	Vitamina K epoxi redutase
Vpp	Peak-to-Peak Voltage

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Breve Histórico	16
1.2 A Biologia de Plasmódios	17
1.3 Epidemiologia	19
1.4 O combate à doença	21
1.5 Isoprenóides	24
1.5.1 Biossíntese de isoprenóides	25
1.5.2 Biossíntese secundária de isoprenóides	
1.6 Funções das prenilquinonas	30
1.7 Biossíntese de isoprenóides em P. falciparum	32
1.7.1 Estresse oxidativo e antioxidantes em P falciparum	
1.8 Justificativas e Objetivos	35
2 METODOLOGIA	37
2.1 Cultura de P. falciparum	
2.2 Marcações metabólicas	38
2.3 Redução e metilação da filoquinona	
2.4 Oxidação de α-tocoferol	39
2.5 Extração de vitamina E, filoquinona e fitol	39
2.6 Extração de fitil-PP	39
2.7 Cromatografia líquida de alta performance de fase reversa (RP-HPLC)	40
2.8 Cromatografia em Camada Delgada (TLC)	40
2.9 Espectrometria de massas	41
2.10 Ensaios de inibição in vitro de culturas sincrônicas de P. falciparum	41
2.11 Níveis de estresse oxidativo	42
2.12 Eletroforese em gel de poliacrilamida	42
2.13 Microscopia de fluorescência	43
2.14 Análises estatísticas	43
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
3.1 Função de vitamina E em <i>P falciparum</i>	45
3.1.1 Caracterização da tocoferolquinona	45
3.1.2 Níveis de EROs e estresse oxidativo	49

3.2 Biossíntese de Filoquinona	54
3.2.1 Caracterização da biossíntese de filoquinona	54
3.2.2 Caracterização de hidrofiloquinona	59
3.3 Via de reaproveitamento de fitol em P. falciparum	62
3.3.1 Biossíntese de vitamina E e K1	62
3.3.2 Caracterização da presença de fitol em P. falciparum	64
3.3.3 Fitilação de proteínas	67
4 CONCLUSÕES	69
REFERÊNCIAS	71
ANEXOS	87
I - In vivo antimalarial activity and mechanisms of action of 4-nerolidylcat	echol
derivatives	88
II - Quantification of nerolidol in mouse plasma using gas chromatography-	mass
spectrometry	99
III - Stabilization and detection of hydrophylloquinone as di-O-methyl derivative	104

1 INTRODUÇÃO

1.1 Breve Histórico¹

Maleita, paludismo, impaludismo, febre terçã ou quartã são nomes dados à malária, uma doença parasitária que acomete o homem. Não se sabe ao certo, porém, existem referências que datam de 4000 a.C. a febres sazonais e intermitentes em textos médicos e religiosos entre os chineses, babilônicos e indianos que relacionavam os sintomas à presença de maus espíritos e à punição de deuses [1].

O grego Hipócrates, o pai da medicina, foi o primeiro a descartar a superstição e a relacionar a doença às estações do ano ou ao local freqüentado pelos doentes. No século V a.C., ele foi o primeiro a diferenciar a malária das demais enfermidades febris, descrevendo detalhadamente o seu quadro clínico da suas complicações. Durante mais de 1500 anos, pouco foi acrescentado ao conhecimento sobre a doença e seu tratamento.

Em 1716, o italiano Giovanni Maria Lancisi observou a presença de pontos negros no cérebro e no fígado de pessoas que morreram devido às complicações relacionadas à malária e associou a doença com as emanações de pântanos. Sugeriu que a doença era causada por vermes ou insetos que habitavam as regiões pantanosas e que podiam infectar o sangue humano. A doença então recebeu o nome de "mal ária", que significa ar insalubre ou mal ar e passou a ser chamada de malária mais tarde [2].

A partir do século XVII, aumentou a preocupação com a doença, pois aumentavam também o número de casos. Até meados de 1900, mais de 80% da população mundial era afligida pela malária, exceto nas regiões polares e subpolares [1].

Em 1880, o médico do exército francês Charles Louis Alphonse Laveran observou formas ovaladas com os mesmos pontos negros presentes no sangue de pacientes com malária e considerou que havia encontrado o parasita causador da doença. O nome *Plasmodium* apareceu pela primeira vez três anos mais tarde, descrito por Marchiafava e Celli, que observaram formas ovóides no interior de hemácias de pacientes com malária. O médico britânico Ronald Ross descreveu o modo de transmissão em 1897, ao encontrar formas do parasita no interior de um mosquito que havia se alimentado de sangue de um portador da doença. O quadro completo do ciclo de desenvolvimento do parasita no homem e na fêmea do mosquito *Anopheles* foi obtido posteriormente por pesquisadores italianos Amico Bignami, Giuseppe Bastianelli e Batista Grassi em estudos realizados entre 1898 e 1899. Após vários

¹ Todas as informações apresentadas no item 1.1 foram obtidas dos sites www.sucen.sp.gov.br; www.rph.wa.gov.au; www.who.int; www.malaria.org; dos artigos Camargo, E.P. Malária, maleita, paludismo. Ciência e Cultura, 2003;55(1):26-29 [1], Coluzzi, M., G. Corbellini, and A. Celli, [*The malariology centenary* (1898-1998). 1898]. Parassitologia, 1998;40(4):361-76 [2] e Trager, W. & Jenson, J. B. *Human malaria* parasites in continuous culture. Science. 1976;193(4254):673-5 [3].

estudos, conseguiram identificar todas as formas evolutivas nos dois hospedeiros. Somente em 1976, William Trager conseguiu cultivar *P. falciparum in vitro* [3], abrindo uma nova era de estudo da doença.

1.2 A Biologia de Plasmódios

Os parasitas que causam a malária pertencem ao filo *Apicomplexa*, ordem *Coccidiida*, subordem *Haemosporidiidea*, família *Plasmodiidae* e gênero *Plasmodium*. São descritas atualmente creca de 150 espécies de parasitas pertencentes ao gênero *Plasmodium*, infectando vários vertebrados como aves, répteis e primatas superiores. Apenas cinco dessas espécies podem infectar o homem: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P kownlesi* e *P. ovale*. A primeira é a espécie responsável pela forma mais grave da doença que pode levar ao óbito e a última é restrita no continente africano.

O ciclo de vida dos plasmódios é complexo e necessita de dois hospedeiros; um vertebrado e outro invertebrado (Figura 1).



Figura 1- Ciclo de vida de plasmódios humanos. Durante o repasto sanguíneo, a fêmea de anofelino infectada inocula esporozoítas no hospedeiro vertebrado (1). Os esporozoítas invadem os hepatócitos (2) e se diferenciam em esquizontes (3), os quais rompem a célula e liberam merozoítas na corrente sanguínea (4). Depois do ciclo hepático, o parasita inicia o ciclo eritrocítico. Os merozoítas invadem os eritrócitos (5) e novamente se diferenciam em esquizontes (6) e liberam mais merozoítas (6). Alguns parasitas se diferenciam em gametócitos (7) que podem ser ingeridos por uma fêmea de anofelino através do repasto sanguíneo (8). Após ingeridos pelo mosquito, as formas sexuais formam o zigoto (9) que por sua vez se diferencia na forma móvel, o oocineto (10), no intestino médio do inseto. Os oocinetos invadem a parede do intestino e se desenvolvem em oocistos (11). Nessa estrutura ocorre a esporogonia e formam-se esporozoítas (12) que são liberados e migram, através da hemolinfa, para as

glândulas salivares do mosquito. No momento da picada, os esporozoítas poderão ser inoculados no hospedeiro vertebrado e, assim, dar seguimento ao ciclo do parasita. Modificado de www.cdc.gov.

No ciclo do hospedeiro vertebrado, acontece a reprodução assexuada denominada esquizogonia. Esse ciclo é subdividido em ciclos hepático e eritrocítico [4]. Quando uma fêmea do mosquito vetor infectada pica o homem, ao realizar o repasto sanguíneo, transfere esporozoítas com sua saliva, os quais alcançam os vasos sanguíneos e tecidos adjacentes. Os esporozoítas que foram lançados nos arredores dos capilares sanguíneos começam a realizar movimentos circulares chamados de *gliding* [5], que possibilitam que eles adentrem nos capilares sangüíneos e, possivelmente, nos capilares do sistema linfático. Após 15-45 min, os esporozoítas que atingiram a corrente sangüínea alcançam o fígado e acabam por invadir as células hepáticas.

Após invadir o hepatócito, origina-se a fase hepática da doença, sendo difícil a detecção do parasita nesse período. Os esporozoítas se diferenciam em trofozoítas. Estes se multiplicam assexuadamente por esquizogonia, dando origem a trofozoítas teciduais e posteriormente a merozoítas. Ocorre então, o rompimento da membrana do hepatócito e a liberação dos merozoítas para a corrente sanguínea, que invadirão os eritrócitos.

O ciclo eritrocítico inicia-se quando merozoítas tissulares invadem os eritrócitos. Durante o desenvolvimento intraeritrocítico, o parasita apresenta os estágios anel ou trofozoíta jovem, trofozoíta maduro e esquizonte. No último estágio, ocorre mais um evento de esquizogonia dando origem a um determinado número de merozoítas por esquizonte, característico de cada espécie de plasmódio. Com a ruptura do esquizonte e do eritrócito, os merozoítas são liberados na corrente sangüínea e invadem novas hemácias dando continuidade ao ciclo eritrocítico.

Ao romper o eritrócito, são liberados merozoítas, meta-hemoglobina, proteínas plasmodiais e cristais de hemozoína ou pigmento malárico, que consistem em monômeros ou dímeros de Ferriprotoporfirina IX (FP). A hemozoína acumulada no citoplasma do eritrócito é liberada no plasma e posteriormente fagocitada pelas células de Kupffler, no fígado, ou pelos macrófagos, no baço e outros órgãos. O ciclo sanguíneo se repete sucessivas vezes a cada 48 horas nas infecções por *P. falciparum, P. vivax* e *P. ovale*, a cada 24 horas nas infecções por *P. knownlesi* e a cada 72 horas nas infecções por *P. malariae*. Os acessos febris característicos de cada espécie estão relacionados com esses ciclos de desenvolvimento. Depois de algum tempo e por fatores ainda desconhecidos, a forma anel se diferencia em gametócitos (masculino ou feminino). Os gametócitos não sofrem mais nenhuma divisão e podem ser encontrados no sangue periférico. Sua vida média pode ser de 60 dias.

A partir da formação dos gametócitos pode iniciar-se o ciclo no hospedeiro invertebrado. Enquanto o anofelino macho se alimenta de néctar e seiva de árvores, a fêmea necessita de sangue em sua alimentação para maturação dos ovos [4].

Durante o repasto sanguíneo, a fêmea do anofelino ingere gametócitos que irão evoluir no inseto. No intestino médio do mosquito, o parasita se reproduz sexuadamente por esporogonia. Depois de 24 horas após a fecundação, o zigoto se diferencia em oocineto e migra para a parede intestinal do inseto, alojando-se entre essas células e a membrana basal do epitélio. O oocineto se transforma em oocisto desenvolvendo uma grossa cápsula, à qual permite a passagem de nutrientes para a geração dos esporozoítas. O oocineto se rompe e libera os esporozoítas que alcançam a hemolinfa do inseto e migram para as glândulas salivares. No momento da picada, os esporozoítas poderão ser inoculados no hospedeiro vertebrado e, assim, dar seguimento ao ciclo do parasita.

1.3 Epidemiologia

Segundo o *World Malaria Report 2014* [6] publicado pela Organização Mundial da Saúde (OMS), foram relatados nas regiões onde ocorre a transmissão cerca de 200 milhões de casos e por volta de 584 mil mortes devido à malária em 2013. Dessas mortes, 90% estão concentradas na África e geralmente acometem crianças menores de cinco anos e gestantes [7-9]. Na Figura 2, são apresentados os casos confirmados de malária em 2013.



Figura 2- Casos confirmados de malaria em 2013. A transmissão de malária ocorre nos cinco continentes em regiões tropicais e subtropicais. Os valores representam os casos confirmados de malária a cada mil habitantes. Modificado de *World Malaria Report 2014* [6].

A transmissão da malária ocorre apenas em regiões tropicais e subtropicais, afetando principalmente países subdesenvolvidos. A afecção está presente em cerca de cem países distribuídos por todos os continentes, passando pelas Américas do Sul e Central, além de México, Índia, sudeste da Ásia, Oriente Médio, Oceania e África. Existem aproximadamente 3,3 bilhões de pessoas vivendo em áreas de risco de transmissão de malária.

Em 2013, segundo dados da OMS, foram registrados 308 mil casos de malária no Brasil (99% na região Norte) com 79 mortes. Atualmente, a área de risco de transmissão está localizada na chamada Amazônia Legal, compreendendo os estados do Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins (Figura 3).



Figura 3- Casos confirmados de malaria no Brasil em 2013. A transmissão de malária no Brasil está restrita à região da Amozônia Legal. Os valores representam os casos confirmados de malária a cada mil habitantes. Modificado de *World Malaria Report 2014* [6].

Essa transmissão não se distribui homogeneamente e aflige principalmente as populações que se estabeleceram com projetos agropecuários, de construção de rodovias, de hidroelétricas e de atividades de garimpo e mineração, desenvolvidas na região Amazônica. Esses movimentos populacionais desordenados são os principais fatores que dificultam o controle da malária.

No Brasil, a espécie mais abundante é o *P. vivax*, com uma prevalência de 79% dos casos, seguido pelo *P. falciparum*, com 20% dos casos e com menos de 1% de *P. malariae*. Podem ocorrer infecções com mais de uma espécie. Em 2001, foi criada no Brasil a Rede Amazônica de Vigilância de Resistência às drogas Antimaláricas (RAVREDA), hoje em parceria com a *Amazon Malaria Initiative* (AMI), e em 2003, foi criado o Programa Nacional de Controle da Malária (PNCM). Com essas iniciativas o Brasil vem tentando conter o

aumento dos casos de malária, trabalhando com novas associações de drogas e com uma melhor distribuição destas para as comunidades nas regiões endêmicas.

1.4 O combate à doença

Após o ciclo completo de desenvolvimento do parasito da malária no homem e na fêmea do mosquito *Anopheles* ter sido descrito pelos pesquisadores italianos, iniciou-se um combate de forma racional à doença.

Na primeira metade do século XX, muitas pesquisas eram dedicadas ao controle da malária, especialmente no sentido de reduzir ou eliminar a presença de criadouros do inseto transmissor, o que se mostrou bastante eficiente em algumas situações. Concomitantemente, pesquisas para o desenvolvimento de novas drogas que combatessem o parasita, propriamente dito, começaram a ser desenvolvidas.

Com base nos conhecimentos adquiridos sobre o inseto transmissor, nas características de inseticida residual do DDT e na existência de drogas efetivas para o tratamento da malária, muitos foram levados a crer na possibilidade de erradicação da doença no mundo, impulsionando a elaboração da campanha de erradicação da malária na Itália (1946-1950) e, depois, para a grande campanha de erradicação da malária em escala mundial, coordenada pela OMS no período de 1957-1969. A proposta da campanha era de erradicação da transmissão em curto prazo baseada em quatro fases: 1) fase preparatória, com reconhecimento das áreas afetadas e do problema epidemiológico, e treinamento de pessoal; 2) fase de ataque, com controle do vetor por meio de aplicação da inseticidas nas casas e tratamento das pessoas; 3) fase de consolidação, com suspensão das medidas de controle e vigilância para possíveis surtos; 4) fase de manutenção e vigilância.

Essa campanha resultou na erradicação da malária nos Estados Unidos da América e na maior parte da Europa, juntamente com novas práticas de agricultura e construção de casas. Na Índia, onde o programa de erradicação foi considerado um exemplo, houve uma redução de 75 milhões de casos em 1958 para 50 mil em 1964.

Segundo a OMS, após 15 anos de campanhas de erradicação, a população mundial em risco foi reduzida de 70% para 41%. Entretanto, após a década de 70, o sucesso do programa não foi mantido, sendo desativado, devido ao alto custo. Até meados de 1990, começaram a ocorrer mais de 300 milhões de casos de malária anualmente e mais de um milhão de mortes eram atribuídas diretamente à doença.

Com o sério problema de saúde pública, foi convocada em 1992, a Conferência Ministerial de Malária, em Amsterdã, Holanda. Foi apresentada uma nova estratégia global de

controle da doença. Mais tarde, em 1997, foi criada a *Multilateral Iniciative on Malaria* (MIM), quando cientistas que trabalhavam com malária estabeleceram prioridades para um programa multidisciplinar de pesquisa em malária. A OMS criou em 1998 o *Roll Back Malaria* (RBM), o qual está em atividade até os dias de hoje e possui grandes ambições para o controle da malária até 2025.

Não existem vacinas eficazes para a malária até o momento [10, 11]. A escolha de qual antígeno do parasita e quais adjuvantes usar para desenvolver uma vacina são os maiores desafios, devido ao parasita apresentar vários estágios de desenvolvimento em diferentes tecidos e órgãos, polimorfismo e variação antigênica [8].

Compostos contra a malária eram utilizados na China há 3000 anos. Os incas, no século XVI, já usavam o extrato da casca da quina para o tratamento da malária. No século XVII, jesuítas encontraram o mesmo princípio ativo utilizado pelos indígenas do Brasil. O quinino é o princípio ativo da quina de uso contemporâneo.

Entre os principais compostos antimaláricos utilizados atualmente na terapêutica da doença encontram-se os aminoquinolinos (cloroquina, amodiaquina, primaquina, quinina, quindina e mefloquina); os antifolatos (sulfadoxina); as diaminopirimidinas (pirimetamina); as lactonas sesquiterpenicas (artemisinina e seus derivados) e alguns antibióticos [12]. A artemisinina e seus derivados são hoje usados em combinação com as demais drogas como primeira-linha no tratamento da malária por não ter apresentado uma resistência disseminada. Entretanto, o que se vem observando é o aumento da resistência aos antimaláricos o que agrava a situação de saúde pública (Figura 4).



Figura 4- Emergência de resistência aos antimaláricos. As barras acima da linha do tempo representam um antimalárico ou combinações entre eles. Os anos à esquerda de cada barra representa o ano de introdução da droga como antimalárico, seguido pelo ano que houve o primeiro relato de resistência à mesma. Os balões abaixo da linha do tempo mostram o registro de resistência à droga e a região onde foi observada. ACTs, terapias combinadas com artemisinina; AQ, amodiaquina; Ato/Pg, atovaquona/proguanil; CQ, cloroquina; Halo, halofantrina; MQ, mefloquina; Q, quinina; R, resistência; S/P, sulfadoxina/ pirimetamina. Modificado de Ekland & Fidock, 2008 [13].

O uso contínuo de um antimalárico em parasitas parcialmente resistentes, confere uma vantagem seletiva de parasitas resistentes e favorece a sua transmissão. Foi descrito que na presença da droga, infecções parcialmente resistentes são acompanhadas por mais gametocitemia que aqueles que são sensíveis [14-16]. Além disso, a resistência aos medicamentos leva à recrudescência com taxas mais elevadas de gametócitos que infecções primárias. Assim, as cepas resistentes à droga geram mais gametocitemia e, portanto, maior potencial de transmissão do que as cepas sensíveis [17, 18]. Em algumas circunstâncias, gametócitos com genes resistentes podem ser mais infecciosos para mosquitos, produzindo um maior número de oocistos e uma infecção mais elevada de mosquitos que aqueles que transportam genes sensíveis [19]. Existem evidências de que as medidas de controle de mosquitos podem eliminar parasitas resistentes a drogas [20]. A existência de reprodução sexuada pelos plasmódios possibilita a recombinação gênica e, com isso, o surgimento de novas cepas resistentes às drogas, usadas para o controle da doença.

Essa resistência se intensifica devido ao uso inadequado de novas drogas, aos recursos financeiros limitados, aos movimentos populacionais, aos serviços de saúde inadequados e à falta de medidas de controle eficientes, levando ao aumento dos casos de morbidade e mortalidade. A crescente resistência às drogas utilizadas na terapêutica, principalmente de isolados de *P. falciparum*, leva à necessidade de estudos sobre novos antimaláricos [13, 21-23].

As linhas de pesquisa para o desenvolvimento de antimaláricos seguem áreas como: inativação da biossíntese de membranas [24-26]; vias metabólicas localizadas no apicoplasto [27-30]; quinases envolvidas no ciclo celular [31, 32]; biossíntese de isoprenóides [33-43] e vias metabólicas localizadas na mitocôndria do parasita [44]. Nosso grupo tem trabalhado nos últimos anos com a caracterização de produtos da biossíntese de isoprenóides em *P*. *falciparum* [34-43] resultantes da via alternativa 2C-metil-D-eritritol-4-fosfato (MEP) [33].

Nesse contexto, a biossíntese de isoprenóides nas formas intraeritrocíticas do parasito tem ocupado um lugar de destaque, como potencial alvo, para o desenvolvimento de novos quimioterápicos para o combate dessa doença. Isso se deve ao fato de que os compostos produzidos por essa via são de suma importância para a sobrevivência de qualquer célula e ao fato de que a via de biossíntese, presente no parasita, é diferente da via de biossíntese de isoprenóides presente em humanos [23, 33]. Somado a isso, foi mostrado que essa via é essencial para o desenvolvimento do parasita e está localizada no apicoplasto [45].

Em 2011, Yeh e DeRisi [45] demonstraram que a única função essencial do apicoplasto é suprir a demanda de pirofosfato de isopentenila (IPP) no parasita. Os autores mostraram que o *P. falciparum* sobrevive a doses letais de fosmidomicina, inibidor da via MEP, quando disponibilizam IPP em meio de cultura. Testaram também se essa recuperação também acontecia quando o parasita era tratado com antibióticos que impediam a síntese proteica no apicoplasto como doxiciclina, clindamicina e cloranfenicol. Além de recuperar o crescimento do parasita, o tratamento contínuo com IPP e antibióticos, fez com que o *P. falciparum* perdesse a organela e seu genoma. Essa cepa depende de um suprimento contínuo de IPP exógeno, que se retirado, causa a morte do parasita [45].

1.5 Isoprenóides

Os prenóis, também chamados de isoprenóides, constituem a mais divergente e grande família de compostos naturais, estando presente em todos os organismos vivos. Até o momento, são conhecidos mais de 30.000 compostos isoprênicos na natureza, sendo metabólitos essenciais para diversas funções celulares, incluindo compostos como ubiquinonas, dolicóis, compostos isoprênicos ligados às proteínas e RNA, hormônios em animais e plantas, carotenóides, vitaminas e óleos essenciais [46].

Eles desempenham funções como a manutenção da fluidez de membrana e agem como hormônios ou sais biliares. São necessários para organismos fotossintéticos e possuem atividades antioxidantes (carotenóides e vitaminas). Ubiquinonas, menaquinonas, filoquinonas e plastoquinonas estão envolvidas no transporte de elétrons. Dolicóis, além de estarem envolvidos na glicosilação de proteínas, podem servir para ancoragem de proteínas a membranas. Muitas proteínas estão ancoradas a membranas via âncoras isoprênicas [46].

Em plantas, hormônios de baixo peso molecular como giberilinas, ácido abscísico e brassinolideos são fundamentais para o desenvolvimento desses organismos. O mesmo ocorre com hormônios sexuais esteroidais e corticosteróides em animais, todos derivados de isoprenóides. Muitos antibióticos, fitoalexinas, repelentes e até drogas alucinógenas e psicotrópicas possuem estruturas derivadas de compostos isoprênicos [46].

A unidade básica de todo isoprenóide é uma molécula de cinco carbonos de fórmula C_5H_8 IPP [47] e seu isômero pirofosfato de dimetilalila (DMAPP) (Figura 5).



Figura 5- Estrutura das moléculas de IPP e DMAPP.

Todo composto isoprênico possui um esqueleto carbônico básico com fórmula $(C_5H_8)_n$. Dependendo da classe de composto isoprênico, essa fórmula pode apresentar variações pela adição de hidroxilas, ciclização da molécula ou outras modificações.

1.5.1 Biossíntese de isoprenóides

A via do Ácido Mevalônico ou Mevalonato (MVA), também conhecida como "via clássica", desde a sua descoberta, acreditou-se que era a responsável pela produção de poliisoprenóides em todos os organismos vivos. A via MVA começa com a conversão de duas moléculas de acetil-CoA a 3-hidroxi-metil-glutaril-CoA. Esta molécula sofre então, em seqüência, redução, fosforilação e descarboxilação, gerando IPP, que é transformado em seu isômero DMAPP pela enzima IPP isomerase. Após a descoberta de que a enzima 3-hidroxi-metil-glutaril-CoA-redutase (HMG-R) é o ponto principal de regulação dessa via [48] que catalisa a reação de 3-hidroxi-metil-glutaril-CoA (HMG-CoA) a mevalonato. Como esse é o primeiro composto único dessa via, ela começou a ser chamada de "via do mevalonato". Vários inibidores para a HMG-R foram encontrados e são chamados de estatinas, usadas para a redução dos níveis de colesterol em humanos. As estatinas são moléculas que apresentam uma semelhança estrutural com HMG e atuam como inibidores competitivos da enzima HMG-R [49]. As enzimas, que atuam nas etapas de biossíntese dessa via, foram isoladas em uma grande variedade de organismos, incluindo animais e plantas. Em todos esses organismos, essas enzimas estão localizadas no citosol da célula.

Porém, começaram a surgir resultados inconsistentes com a via do mevalonato em bactérias. Estudos com [¹³C]acetato (um precursor da via do mevalonato) mostraram que essa molécula não era incorporada em ubiquinonas de *Escherichia coli* [50]. Tais dados somados ao fato de que mevinolina, um inibidor específico da enzima HMG-CoA redutase, não inibia o crescimento de *Escherichia coli* [50], levaram a acreditar na existência de uma nova via de biossíntese de isoprenóides em alguns organismos. Cinco anos mais tarde, em 1996, essa outra via de biossíntese de isoprenóides seria descrita.

Essa segunda via descrita foi a do 2C-metil-D-eritritol-4-fosfato (MEP) ou "via alternativa". A via começa com a condensação de uma molécula de piruvato com uma molécula de gliceraldeído 3-fosfato, pela enzima 1-desoxi-D-xilulose 5-fosfato sintase (DXS) formando 5-fosfato 1-desoxi-D-xilulose (DOXP) [51], enzima esta que é dependente de tiamina (vitamina B₁) [52]. A DOXP é o primeiro intermediário da via, mas não é exclusivo, sendo utilizado também para a biossíntese de piridoxal (vitamina B_6) [53, 54] e tiamina (vitamina B₁) [55]. Na etapa seguinte, a enzima 1-desoxi-D-xilulose 5-fosfato redutoisomerase (DXR) catalisa simultaneamente o rearranjo intramolecular e redução da DOXP em MEP [56]. A enzima que catalisa essa etapa da via é inibida por um composto utilizado inicialmente como herbicida, chamado fosmidomicina (ácido fosfônico) [57]. Posteriormente, o MEP é ligado a uma molécula de trifosfato de citidina (CTP) para produzir 4-(citidina-5-difosfo)-2C-metil-D-eritritol (CDP-ME), em uma reação catalisada pela enzima 2C-metil-D-eritritol-4-fosfato citidina transferase (MCT) [58]. A enzima 4-(citidina-5difosfo)-2C-metil-D-eritritol quinase (CMK) (uma enzima dependente de ATP) fosforila o CDP-ME, produzindo 4-(citidina-5-difosfo)-2C-metil-D-eritritol-2-fosfato (CDP-MEP). No passo seguinte, o CDP-MEP é convertido em 2C-metil-D-eritritol-2,4-ciclodifosfato (MEcPP) pela ação da enzima 2C-metil-D-eritritol-2,4-ciclodifosfato sintase (MCS) [59, 60]. O produto MEcPP é reduzido a 1-hidroxi-2-metil-2-(E)-butenil 4-difosfato (HMBPP) pela enzima hidroximetilbutenil difosfato sintase (GcpE) [61, 62]. Posteriormente, o HMBPP é convertido em IPP e DMAPP pela hidroximetilbutenil difosfato redutase (LytB) [62-64] (Figura 6).



Figura 6- Via MEP. À esquerda estão as estruturas moleculares dos intermediários da via e à direita entre os nomes dos intermediários estão as enzimas. O símbolo ^S representa o local de atuação da fosmidomicina (DXR). Intermediários: GAP, gliceraldeído 3-fosfato; DOXP, 5-fosfato 1-desoxi-D-xilulose ; MEP, 2C-metil-D-eritritol 4-fosfato; CDP-ME, 4-(citidina-5'-difosfo)-2C-metil-D-eritritol; CDP-MEP, 4-(citidina-5'-difosfo)-2C-metil-D-eritritol 2-fosfato; MECPP, 2C-metil-D-eritritol 2,4-ciclodifosfato; HMBPP, 1-hidroxi-2-metil-2-(E)-butenil 4-difosfato; IPP, pirofosfato de isopentenila; DMAPP, pirofosfato de dimetilalila. Enzimas: DXS, 1-desoxi-D-xilulose 5- fosfato sintase; DXR, 1-desoxi-D-xilulose 5-fosfato redutoisomerase; MCT, 2C-metil-D-eritritol 4-fosfato citidina-transferase; CMK, 4-(citidina-5'-difosfo)-2C-metil-D-eritritol quinase; MCS, 2C-metil-D-eritritol 2,4-ciclodifosfato sintase; GcpE, hidrometilbutenil pirofosfato sintase; Lyt B, hidrometilbutenil pirofosfato redutase; IPP isomerase, isopentenil pirofosfato isomerase.

Em fungos, mamíferos, alguns protozoários e arqueobactérias, os isoprenóides derivam da via clássica do MVA. Enquanto que em algas, eubactérias, cianobactérias e protozoários do filo apicomplexa, a via MEP é essencial para a biossíntese desses compostos. As plantas superiores apresentam ambas as vias, no entanto em locais diferentes. A via MVA ocorre no citoplasma e a via MEP em plastídeos [65-68].

A organela presente em organismos do filo Apicomplexa - O Apicoplasto - se assemelha aos plastídeos de plantas [27, 30]. Estudos mostram indícios da existência de uma

endosimbiose de um plastídeo que ocorreu nos organismos do filo. Essa organela manteve algumas características de organismos fotossintetizantes [69].

1.5.2 Biossíntese secundária de isoprenóides

Após a síntese do IPP e do DMAPP, esses intermediários passam para o metabolismo secundário de isoprenóides, que consiste basicamente no alongamento inicial da cadeia isoprênica, passando posteriormente por diferentes modificações para a formação dos diferentes produtos derivados da biossíntese de isoprenóides. O termo poliisoprenol é usado para prenóis com mais de quatro unidades isoprênicas.

Inicialmente, uma molécula de IPP reage com uma molécula DMAPP por meio de enzimas chamadas preniltransferases, dando origem ao pirofosfato de geranila (GPP, 10 carbonos). O GPP é ligado a um IPP, originando o pirofosfato de farnesila (FPP, 15 carbonos) que, por sua vez, reage com mais uma molécula de IPP, dando origem ao pirofosfato de geranilgeranila (GGPP, 20 carbonos). A partir desse ponto os isoprenóides podem ser ligados à proteínas, ao RNA ou à anéis aromáticos, formando prenilquiononas (ubiquinonas e vitaminas). Duas moléculas de GGPP podem ser condensadas no modo cabeça-cabeça e dar origem ao fitoeno, molécula-base para a biossíntese de carotenóides, formação de hormônios, dentre outros.

O GGPP pode ser reduzido pela geranilgeranil redutase [70], formando o pirofosfato de fitila (fitil-PP), o qual pode ser ligado a anéis aromáticos, formando vitaminas E [71] e filoquinona [72]. O fitil-PP pode ser condensado em um anel de cromanol ou de 1,4 dihidroxi-2-naftoato, provenientes da via do Chiquimato, para a formação das vitaminas E e K1, respectivamente (Figura 7).



Figura 7- Via de biossíntese para as vitaminas E e K1. Ambas as vitaminas são provenientes das Vias MEP e Chiquimato com a diferença que o α-tocoferol recebe um anel de cromanol enquanto que a filoquinona recebe um anel de 1,4 dihidroxi-2-naftoato. Utilizamos como precursores o GGPP e o Fitil-PP. Abreviações: GAP, gliceroaldeído 3-fosfato; PEP, fosfoenolpiruvato; IPP, Pirofosfato de isopentenila; DMAPP, pirofosfato de dimetilalila.

Em plantas superiores, a maior parte do fitil-PP é direcionado para a biossíntese de clorofila, pela enzima clorofila sintase e durante a senescência são formados clorofilídeos e fitol em sua degradação. O fitol é tóxico para as plantas em sua forma livre. Foi mostrada uma via alternativa para a biossíntese de fitil-PP a partir do fitol liberado na hidrólise da clorofila em *Arabidopsis thaliana* [73] (Figura 8).



Figura 8- Esquema da via de reaproveitamento de fitol em *Arabidopsis thaliana*. O fitol é formado a partir da degradação da clorofila e pode ser degradado, ligado a ácidos graxos ou fosforilado para a formação de clorofila, filoquinona e tocoferol.

O fitol pode ser fosforilado e utilizado para biossintetizar novamente a clorofila, vitamina E, vitamina K_1 ou ser incorporado nos ácidos graxos da membrana de cloroplastos, possivelmente para evitar possíveis danos ao aparato fotossintético [73, 74].

Nos últimos 20 anos, estudos sobre isoprenilação de proteínas em *Arabidopsis thaliana* [75] e *Spinacia oleracea* (espinafre) [76] foram mostrados por meio de marcações metabólicas e análises por *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC), que além dos poliprenóis clássicos envolvidos na isoprenilação de proteínas como o GGPP, dolicóis e FPP, também eluíam compostos radioativos com o mesmo tempo de retenção do padrão de fitol. Parmryd et al. [77] confirmaram que realmente se tratava da estrutura química de fitol por cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massas (GC/MS).

1.6 Funções das prenilquinonas

As prenilquinonas possuem um anel aromático polar e uma cadeia isoprênica apolar. A cadeia isoprênica confere um caráter lipossolúvel e ancora em membranas lipídicas o grupo hidrofílico do anel aromático, que possui a atividade da prenilquinona. A maioria das prenilquinonas pertence às Naftoquinonas e Benzoquinonas.

Existem diversos sistemas onde as prenilquinonas atuam como transportadores de prótons e elétrons, por exemplo: ubiquinona atua na cadeia respiratória de células eucarióticas na membrana da mitocôndria [78], plastoquinona [79] e filoquinona atuam na fotossíntese de plantas na membrana de tilacóides de cloroplastos [80]e menaquinona e ubiquinona atuam na fotossíntese bacteriana [81]. Por possuírem a capacidade de transferir equivalentes redutantes,

elétrons ou prótons em uma fase lipídica, diversos estudos têm focado a associação de prenilquinonas com a transdução de energia levando à formação de ATP.

Sendo facilmente reduzidas pelas dehidrogenases ligadas a membranas, as prenilquinonas também podem atuar como parte da maquinaria antioxidante da célula [82]. Dois mecanismos de ação para prevenção de danos exercidos pelas hidroquinonas podem ser apontados: a proteção baseada na redução direta de radicais lipídicos e de oxigênio pelos quinóis como α -tocoferol e ubiquinonas [47, 83, 84] ou a proteção baseada na reciclagem de antioxidantes [85, 86]. Por exemplo, a eficiência antioxidante da vitamina E (formada pela condensação de um anel de cromanol a uma cadeia de fitil-PP [71]) é ampliada por meio da reciclagem dos seus produtos oxidados, o tocoferoxila e tocoferolquinona. Esse processo, também chamado de ciclo redox do α -tocoferol, é importante na otimização da função antioxidante da vitamina E [83]. A reciclagem *in vitro* do α -tocoferol, a partir de seus radicais oxidados, pode ser mediada pela vitamina A [87, 88], vitamina C [85, 86, 89] e coenzima Q [90, 91]. Entretanto, existem dúvidas sobre a significância da reciclagem de tocoferoxila ou epoxitocoferoxila pelas vitaminas A e C *in vivo* [92].

Em plantas, a filoquinona é formada pela condensação de um anel de 1,4 dihidroxi-2naftoato a uma cadeia de fitil-PP [72] e sua função está relacionada com transporte de elétrons no fotossistema I [93]. Recentemente foram levantadas outras hipóteses de funções para a filoquinona em plantas, além de transportadora de elétrons. Foi detectada a forma reduzida da vitamina K1, a hidrofiloquinona, em menores quantidades em folhas de *Arabidopsis* mantidas sob luz quando comparadas com as que foram mantidas no escuro. Os autores sugerem que a hidrofiloquinona provavelmente não esteja relacionada com o *pool* fotoativo de filoquinona e que esteja envolvida na clororespiração [94]. Outros estudos mostram que aproximadamente 50% do total de filoquinona não está associada ao fotossistema I e provavelmente participe do sistema antioxidante [72, 95].

Em vertebrados, a filoquinona e em especial a hidrofiloquinona servem como um cofator para certas carboxilases que convertem resíduos específicos de glutamato em proteínas alvo para γ -carboxiglutamatos (Gla) [96] as quais estão envolvidas na coagulação do sangue, homeostase óssea e na manutenção da integridade vascular [97, 98]. Como coproduto dessa carboxilação forma-se a filoquinona totalmente oxidada, a epoxi filoquinona, forma que é biologicamente inativa. Para acontecer a reciclagem da vitamina K1 (ou Ciclo da vitamina K1), a enzima vitamina K epoxi redutase (VKOR) reduz a forma epoxi em filoquinona e depois em hidrofiloquinona [99]. Essa atividade pode ser inibida pela warfarina [100-102].

1.7 Biossíntese de isoprenóides em P. falciparum

Em 1999, Jomaa et al. [103] identificaram em *P. falciparum* os genes que codificam as enzimas-chave da via MEP, a DXS e a DXR. A primeira catalisa a condensação do D-gliceraldeido 3-fosfato e do piruvato formando o 5-fosfato 1-desoxi-D-xilulose, enquanto a segunda catalisa o rearranjo molecular e reduz esse produto nas formas isoprênicas básicas [46]. Estudos foram realizados pelo mesmo grupo utilizando fosmidomicina e um análogo a este antibiótico, o FR900098, os quais inibem a enzima DOXP-redutoisomerase. A administração dos dois compostos em ensaios *in vitro* inibiu o crescimento da cultura. Nos estudos em camundongos houve uma queda na parasitemia chegando a <1% e depois de oito dias estavam curados. Porém, quando o tratamento foi feito em quatro dias, observou-se recrudescência [103], indicando que a simples monoterapia com fosmidomicina ou seu análogo pode não ser suficiente para os casos clínicos de malária [61, 104, 105]. Em 2004, Cassera et al. [36] demonstraram que a via MEP era funcionalmente ativa em *P. falciparum* isolando e caracterizando os produtos intermediários. O estudo, além de confirmar a presença da via no parasito, apresentou pela primeira vez a biossíntese de piridoxina 5-fosfato em um protozoário do filo Apicomplexa.

Foi demonstrado em nosso laboratório que os três estágios intraeritrocíticos de *P*. *falciparum* biossintetizam isoprenóides que se ligam a proteínas. O estudo foi realizado por meio de marcações metabólicas com [³H]GGPP às quais apresentaram bandas marcadas radioativamente de proteínas com massas moleculares aproximados de 6-7 kDa, 21-28 kDa nos três estágios parasitários. Quando o precursor utilizado foi o [³H]FPP, além das bandas com massa molecular igual às marcadas com [³H]GGPP, uma nova banda de com peso molecular aproximado de 50 kDa foi detectada. Já, Moura et al. [38] fizeram experimentos de imunoprecipitação com anticorpos monoclonais anti-Ras e anti-Rap, que reconhecem as proteínas p21^{ras} e p21^{rap} do parasita, marcados metabolicamente com os mesmos precursores radioativos para demonstrar a isoprenilação de proteínas. Foi demonstrado também que poliisoprenódes como os dolicóis se ligam às proteínas [24].

O parasita biossintetiza cadeias isoprênicas ligadas ao anel benzoquinona da coenzima Q de 8 e 9 unidades e a síntese dessas são inibidas pelo nerolidol, cujo efeito é interferir no alongamento das cadeias isoprênicas [35]. Em 2005, Tonhosolo et al. [40] clonaram e expressaram uma octaprenil pirofosfato sintase de *P. falciparum*, cuja função é o alongamento da cadeia isoprênica que se liga ao anel benzoquinona. Rodrigues Goulart et al. [39] testaram terpenos como nerolidol, o qual apresentou uma ação inibitória na biossíntese de dolicóis e da

cadeia isoprênica ligada ao anel de benzoquinona das ubiquinonas. Recentemente, descrevemos o mecanismo de ação de um derivado natural de nerolidol, o 4-nerolidilcatecol (Anexo I). Com o intuito de iniciar estudos *in vivo* sobre a ação do nerolidol, desenvolvemos um método de detecção e quantificação em plasma de camundongos tratados com nerolidol (Anexo II). Futuramente, iremos avaliar o efeito desse terpeno na parasitemia de camundongos infectados por *P. berguei*.

Nosso grupo identificou, por marcação metabólica com [³H]GGPP em culturas assincrônicas, a presença de moléculas que eluíam em tempos de retenção diferentes às dos isoprenóides anteriormente caracterizados através do método de *Reversed Phase - High Performance Liquid Chromatography* (RP-HPLC). Confirmou-se que esses compostos eram carotenóides biossintetizados por *P. falciparum* [41], compostos pela primeira vez caracterizados em parasitas. A presença da via ativa para a biossíntese de carotenóides em *P. falciparum* nos remete a dar atenção ao apicoplasto. Por ser uma organela muito similar aos plastídios de plantas, acredita-se que possa apresentar o mesmo perfil metabólico [27, 30], em que a via MEP é utilizada para a biossíntese de carotenóides e vitaminas A, E e K, entre outros produtos, até então, considerados de biossíntese exclusiva em organismos fotossintéticos.

Passamos a procurar produtos da via MEP, assim como carotenóides, até então ditos de biossíntese exclusiva de plantas, bactérias e fungos. Caracterizamos bioquimicamente a biossíntese de menaquinona-4 nos três estágios intraeritrocíticos de *P. falciparum*. A droga Ro 48-8071 inibe a biossíntese dessa vitamina e o crescimento do parasita. A menaquinona-4 atua no transporte de elétrons na cadeia respiratória do parasita [42]. Além disso, existe um equilíbrio no *pool* de menaquinona-4 e ubiquinona, quando uma é inibida, a biossíntese da outra é aumentada, assim como mostrado em bactérias [81].

1.7.1 Estresse oxidativo e antioxidantes em P falciparum

O plasmódio é sensível ao estresse oxidativo *in vitro* e *in vivo* e diversas drogas atuam no sistema redox do parasita como a cloroquina [106] e cercosporina [107]. Para minimizar os danos causados pelas espécies reativas, toda a bateria de enzimas antioxidantes e seus substratos encontrados nos parasitos e nas hemácias devem estar funcionalmente presentes [108]. Algumas enzimas relacionadas com o sistema da glutationa já foram descritas em espécies de *Plasmodium* como a glutationa sintase [109] e redutase [110], superóxido dismutase [111], glutamato desidrogenase [112] e glicose 6-fosfato desidrogenase [113]. Eritrócitos infectados perdem a habilidade de fazer a síntese *de novo* de glutationa porque o

intermediário γ -glutamil-cisteína é depletado da célula [114]. Essa desvantagem é compensada pela exportação ativa de glutationa oxidada, pelo parasita, no citoplasma do eritrócito, onde ela é reduzida pela glutationa redutase da célula e pelas enzimas da via das pentoses, que são 25 vezes mais ativas [114]. Além disso, o parasita possui o sistema da tioredoxina funcional compreendendo tioredoxina redutase [115], tioredoxina [116], tioredoxina [117], assim como 1-*cis*-peroxiredoxina [25].

A hemoglobina representa a maior fonte de aminoácidos para o parasita, entretanto sua degradação em um vacúolo digestivo acidificado resulta na produção do grupo heme tóxico FP e EROs. Para se proteger, o protozoário cristaliza a porção heme liberada durante a proteólise da hemoglobina em um pigmento insolúvel menos tóxico chamado hemozoína ou β -hematina [118]. Outros meios alternativos de detoxificação da FP incluem a degradação da FP [119], reações com a glutationa [120] e proteínas que se ligam à FP [121]. Contudo, análises químicas de eritrócitos infectados indicam que a maioria da FP está localizada no vacúolo digestivo e pelo menos 90% está presente na forma hemozoína [122]. As EROs podem causar impressões digitais do estresse oxidativo nas membranas dos glóbulos vermelhos infectados, como a agregação de banda 3 [123] e o aumento dos lipoperóxidos [124]. O sistema de defesa antioxidante da hemácia é constituído, principalmente, por enzimas catalase, superóxido dismutase [125], glutationa redutase, glutationa peroxidase, metahemoglobina redutase dependente de NADPH [126]; por vitaminas (vitamina E e ácido ascórbico) e glutationa reduzida [127].

Produtos finais da via de isoprenóides como a vitamina E podem atuar como antioxidantes e na estabilização de membranas, como descritos em plantas [128] e cianobactérias [129], e estes dados nos fazem supor que a vitamina E, biossintetizada pelo parasita, poderia atuar dentro dos sistemas antioxidantes descritos acima.

O parasita biossintetiza α -tocoferol nos três estágios intraeritrocíticos. Culturas de *P*. *falciparum* tratadas com ácido úsnico tiveram o crescimento e a biossíntese de vitamina E inibidos [43]. Quando cultivamos os parasitas com uma tensão de oxigênio de 20%, ao invés de 5%, a biossíntese de α -tocoferol está aumentada quando comparada com os parasitas cultivados em condições normais [43]. Consequentemente, a lipoperoxidação também aumenta quando inibimos a biossíntese de vitamina E [43]. Fato esperado, uma vez que a principal função da vitamina E é evitar a autooxidação de ácidos graxos poliinsaturados [84, 130].

Em tilacóides de espinafre, o α -tocoferol em conjunto com a vitamina K₁ e plastoquinona atuam como *scavenger* de superóxidos formados pelo fotossistema I, reduzindo

a difusão desse radical na superfície da membrana e inibindo a formação de peróxido de hidrogênio, resultando na proteção das membranas dos tilacóides contra a lipoperoxidação [131]. Foi mostrada por meio de marcações metabólicas com L-[U-¹⁴C] tirosina a presença de tocoferóis radioativos em frações sub-celulares como cloroplastos, mitocôndria e microssomos de *Calendula officinalis* [132]. Resultados preliminares *in vitro* de nosso laboratório apontam que a vitamina E, biossintetizada pelo parasita, pode interferir na lipoperoxidação de eritrócitos infectados. Entretanto, esses resultados não nos mostram a sua real função, sendo necessária a demonstração dos seus produtos oxidados, tocoferoxila e tocoferolquinona e dos níveis de estresse oxidativo ao se inibir sua biossíntese, para comprovar nossa hipótese sobre o possível envolvimento da vitamina E na defesa antioxidante em *P. falciparum*.

1.8 Justificativas e Objetivos

A biossíntese de isoprenóides pela via MEP tem sido apontada como um importante alvo para o desenvolvimento de novos antimaláricos devido à importância dos produtos derivados dessa via direcionados para o metabolismo de qualquer célula eucariótica e, principalmente, ao fato de a via de biossíntese de isoprenóides no parasita ser diferente da existente em seu hospedeiro vertebrado.

Nosso grupo mostrou que o parasita é capaz de biossintetizar, a partir do IPP, o composto GGPP [133], um intermediário chave para a biossíntese das vitaminas E e K₁. O parasita biossintetiza α e γ -tocoferol nos três estágios intraeritrocitários e o ácido úsnico é capaz de inibir essa biossíntese [43]. Contudo, ainda não foi mostrado se a vitamina E, biossintetizada pelo parasita, é realmente empregada na defesa contra o estresse oxidativo provocado pelo seu metabolismo e pelo hospedeiro.

Temos evidências de que a via metabólica de filoquinona esteja ativa no parasita, porém é necessário identificar a via de biossíntese. A mesma poderá ser explorada para se estudar a função da vitamina no parasita e identificar possíveis alvos para antimaláricos.

O fato de o parasita biossintetizar vitamina E e possivelmente filoquinona, somado à detecção de um composto radioativo com o mesmo fator de retenção do fitol em análises por TLC de eritrócitos parasitados marcados com [3 H]IPP, nos impele a estudar esse composto em *P falciparum*, uma vez que o fitol apresenta um metabolismo bem regulado em *Arabidopsis sp* [73].

Com base nas informações descritas acima, os objetivos de trabalho foram:
• Determinar se a vitamina E atua na proteção contra o estresse oxidativo em *P*. *falciparum* identificando seus produtos oxidados;

- Medir os níveis de estresse oxidativo em *P. falciparum* quando a biossíntese de vitamina E é inibida;
- Caracterizar a via de biossíntese de filoquinona em *P. falciparum*;
- Detectar a presença de hidrofiloquinona e fitil-PP em *P. falciparum;*
- Verificar se a via de reaproveitamento de fitol é ativa em *P. falciparum*.

2 METODOLOGIA

2.1 Cultura de P. falciparum

O cultivo da cepa 3D7 de *P. falciparum* foi realizado em garrafas contendo meio RPMI-1640 suplementado com 25 mM de Hepes, 21 mM de bicarbonato de sódio, 300 mM de hipoxantina, 11 mM de glicose, 40 g/ml de gentamicina e 0,5% (v/v) de AlbuMAX. Eritrócitos foram adicionados à cultura obtendo um hematócrito de 1 a 3%. As garrafas foram mantidas em estufa a 37 °C com trocas diárias de meio e injeção de uma mistura gasosa composta por 5% CO₂, 5% O₂ e 90% N₂. O controle da parasitemia foi feito com a verificação microscópica diária de esfregaços corados com Giemsa [134].

A sincronização da cultura de *P. falciparum* foi feita com Sorbitol (5%) e/ou por flotação em gelatina. Na primeira técnica, o sorbitol rompe hemácias infectadas contendo as formas maduras do parasita (trofozoíta maduro e esquizonte), deixando íntegras apenas hemácias com as formas mais jovens (anel) que são devolvidas à cultura. As culturas com mais de 10% de parasitemia, a maioria no estágio anel jovem, foram centrifugadas a 800 *x g* por 10 minutos. Depois de retirar o sobrenadante foi adicionado o Sorbitol na proporção 1:25 (v/v, *pellet*:solução a 37 °C). Após incubar em banho-maria a 37 °C por 5 minutos, a solução foi centrifugada a 800 *x g* por 10 minutos. O *pellet* foi introduzido novamente na cultura que corresponde a um concentrado de parasitas sincronizados no estágio anel [135]. No mesmo ciclo em que o parasita foi sincronizado com Sorbitol, ele será submetido à flotação em gelatina das formas maduras [136].

Para a separação das formas maduras de *P. falciparum*, foi empregada a técnica de coluna magnética [137]. Os parasitas foram coletados e lavados três vezes com tampão fosfato-salino (PBS) (30 mM Na₂HPO₄, 6 mM KH₂PO₄, pH 7.4, 120 mM NaCl). O volume do precipitado de cada purificação foi medido, liofilizado e congelado em nitrogênio líquido para posterior análise.

2.2 Marcações metabólicas

Culturas sincrônicas de *P. falciparum* com pelo menos 15% de parasitemia foram marcadas com pirofosfato de geranilgeranila tritiado ([³H]GGPP) (14 Ci/mmol, 1 mCi/mL; Amersham), pirofosfato de fitila tritiado ([³H]fitil-PP) (20 Ci/mmol, 1 mCi/mL; Amersham) ou fitol tritiado ([³H]fitol) (20 Ci/mmol, 1 mCi/mL; Amersham) de 12 a 16 horas. São agregados à cultura de parasitas 0,75 μ Ci/mL do precursor radioativo utilizado. Como controle, marcamos eritrócitos não parasitados com as mesmas quantidades.

2.3 Redução e metilação da filoquinona

Este item está detalhado no manuscrito (Anexo III) submetido para o *Journal of Chromatograph B* e está em análise.

2.4 Oxidação de α-tocoferol

Utilizamos o protocolo descrito por Liebler et al. [138], os quais empregam a análise por RP-HPLC e GC/MS. O produto foi obtido a partir da oxidação do α -tocoferol pela adição de 0,15 mM de hidroperóxido de cumeno e 0,1 mM de Fe(NH₄)₂(SO₄)₂ em Tris-acetato, pH 7. Incubamos a solução por 15 minutos a 37 °C. A oxidação foi cessada pela adição de 1mM de mesilato de deferroxamina, sendo que as formas oxidadas foram extraídas três vezes com hexano e analisadas por técnicas cromatográficas e/ou espectrometria de massas.

2.5 Extração de vitamina E, filoquinona e fitol

A cada $1,5.x10^9$ eritrócitos infectados liofilizados (300 µL) foi adicionado 1 mL de água deionizada em tubos de vidro. A lise das células foi feita por utrassom em um disruptor de células e as proteínas foram precipitadas adicionando 200 µL etanol-0,01% hidroxitolueno butilado (BHT). Depois de misturar por 1 min em um vortex, foi feita a extração por três vezes com 2 mL de n-hexano-0,01% BHT. A amostra foi misturada por mais 1 minuto em um vortex e centrifugada a 2700 *x g* por 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para um tubo de vidro e evaporado em uma corrente de nitrogênio à temperatura ambiente. O resíduo foi ressuspenso na fase móvel - depende do sistema utilizado - e submetido às análises cromatográficas e/ou às técnicas de espectrometria de massas.

2.6 Extração de fitil-PP

Após a lise das células por ultrassom em um disrruptor de células, a extração de fitil-PP, de eritrócitos infectados, foi feita três vezes com a adição de butanol saturado com água em uma razão solvente:amostra (3:1, v/v). A solução foi misturada por 1 min em um vortex e centrifugada a 3000 x g por 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para um tubo de vidro e evaporado em uma corrente de nitrogênio à temperatura ambiente. O resíduo foi ressuspenso na fase móvel - depende do sistema utilizado - e submetido às análises cromatográficas e/ou às técnicas de espectrometria de massas.

2.7 Cromatografia líquida de alta performance de fase reversa (RP-HPLC)

Padronizamos sistemas de RP-HPLC que separavam de forma satisfatória compostos isoprênicos existentes em *P. falciparum* e que utilizam [³H]GGPP, [³H]fitil-PP ou [³H]fitol como precursores. Em todos os sistemas de RP-HPLC ensaiados, foram determinados os tempos de retenção de compostos isoprênicos como poliisoprenóides, carotenóides, ubiquinonas, entre outros já descritos no parasita.

Empregamos como fase estacionária a coluna Phenomenex Luna C18 (250 mm x 4,6 mm x 5 μm) (Phenomenex, CA, USA) acoplada a pré-coluna C18 (Phenomenex, CA, USA), um detector UV Gilson 152/UV-vis ou um detector de arranjo de diodo (DAD) Gilson 170 e um coletor de frações FC203B. O software utilizado para o processamento de dados será o UnipointTM LC 3.0 System Software. Os sistemas utilizados foram:

- Sistema I

As amostras foram eluídas de modo isocrático, em um fluxo de 1 mL/min, em metanol. As frações foram coletadas por minuto.

- Sistema II

As amostras foram eluídas em um gradiente linear, entre (A) metanol e (B) acetonitrila, que consistiu em iniciar com 50:50 de (A/B), de 0-28 minutos 30/70 (A/B), 28-30 minutos 50:50 (A/B), proporção que mantivemos por mais 30 minutos. O fluxo foi de 1 mL/min. As frações foram coletadas por minuto.

- Sistema III

As amostras foram eluídas em um gradiente linear entre (A) bicarbonato de sódio (NaHCO₃) 25mM e (B) acetonitrila, que consistiu em iniciar com 70:30 de (A/B), de 0-20 minutos 0/100 (A/B), 20-39 minutos 0:100 (A/B) voltando à condição inicial de 39-40 minutos. O fluxo foi de 1 mL/min. As frações foram coletadas por minuto..

2.8 Cromatografia em Camada Delgada (TLC)

A pré-purificação dos extratos de parasitas para a identificação de fitil-PP foi feita em placas Kieselgel silica gel plates 250F (20 x 20 cm, Merck) usando isopropanol:amônia (25%):água (6:3:1, v/v/v). A identificação e separação dos produtos da redução e metilação da filoquinona foi feita em placas de alumínio Merck Kieselgel silica gel (60F-254) (20 x 20 cm, Merck) usando hexano:acetato de etila (9:1, v/v) como fase móvel. Em todas as amostras analisadas, uma canaleta com os padrões foi utilizada para calcular o fator de retenção (R*f*). Após a corrida, as placas foram secas e o R*f* dos compostos de interesse foi calculado

visualizando as bandas com vapor de iodo ou imergindo as placas em uma solução de etanol contendo 15% de H_2SO_4 e aquecendo a 100 °C.

2.9 Espectrometria de massas

As frações oriundas das purificações por cromatografias e/ou extratos lipídicos brutos foram analisadas por espectrometria de massas para confirmação da estrutura da molécula. As técnicas de espectrometria de massas utilizadas foram:

LCQ Duo[™] (ThermoFinnigan, USA) que utiliza uma nano-fonte de ionização tipo *eletrospray* (ESI). Os espectros foram processados com o software Xcalibur® 2.0 (Copyright © Thermo Electron Corporation, USA).

- *GC-MS (Gas chromatography – Mass spectrometry) Y2K (on trap mass spectrometer (MS) PolarisQ System* (Finnigan, ThermoQUEST Inc., San Jose, CA) que utiliza uma nanofonte de ionização tipo *electron impact* (EI)., composto por *PolarisQ MS, TRACE GC* e um programa de análise de dados *Xcalibur* versão 1.3.

- micrOTOF-QII (Bruker) que utiliza uma nano-fonte de ionização tipo *eletrospray* (ESI). O equipamento foi operado em modo negativo com voltagem do capilar de 3500 V, gás de nebulização de N₂ de 2 Bar, gás de secagem de N₂ de 4 L/min e temperatura de secagem de 180 °C. O Funnel 1 utilizado foi RF: 400 Vpp, energia do quadrupolo: 6 eV, energia de colisão: 12 eV e hexapolo RF: 200 Vpp. No MS/MS foi utilizada uma energia de colisão de 0 a 20 eV.

Em todos os ensaios foram analisadas quantidades equivalentes de hemácias e meio de cultura com os mesmos procedimentos descritos para as amostras de parasitas.

2.10 Ensaios de inibição in vitro de culturas sincrônicas de P. falciparum

Utilizamos o método de Desjardins [139] para determinação da concentração inibitória de 50% do crescimento (valor de IC₅₀) de cercosporina em culturas de *P. falciparum*. Esses testes foram feitos em placas de cultura de células com 96 poços (Eppendorf). Foram utilizadas concentrações diferentes da droga em estudo e mais dois controles, um onde não foi colocada a droga e outro somente com o solvente em que a droga foi diluída. A cercosporina foi diluída em dimetilsulfóxido (DMSO) e depois diluída seriadamente em meio de cultura até alcançar as concentrações desejadas. Foram feitos esfregaços diários para o controle da parasitemia.

2.11 Níveis de estresse oxidativo

Eritrócitos infectados e não infectados foram incubados por 30 minutos com 5µM de CellRox (Molecular Probes®), kit para avaliar o estresse oxidativo. O fluoróforo utilizado para a marcação de ácidos nucleicos para separar a população de eritrócitos infectados foi o SYTO 16 *Green* (Molecular Probes®) em uma concentração de 40 nM durante os 5 últimos minutos da marcação com CellRox. Com outro lote de eritrócitos infectados e não infectados, fizemos o mesmo protocolo descrito com a diferença que incubamos previamente por 30 minutos com H_2O_2 em uma concentração de 0,5 µM. Após a incubação e marcação com os fluoróforos, as células foram lavadas três vezes com PBS. Fizemos as análises por citometria de fluxo em um *Guava Easycyte Mini System* onde o feixe de excitação empregado foi o de 488nm(argônio) e os filtros de emissão foram os 680nm (vermelho) e 525nm (verde) onde foram comparados os níveis de estresse oxidativo.

2.12 Eletroforese em gel de poliacrilamida

Para a análise da possível fitilação de proteínas, a extração dos produtos que incorporaram fitol e fitil marcados radioativamente foi realizada conforme descrito por Goulart et al. [39]. Cada estágio do parasita foi lisado com tampão de lise contendo 10 mM de TRIS-HCl pH 7,2, 150 mM de NaCl, 2% de Triton X-100 (v/v), 0,2 mM de fenilmetilsulfonil fluorido (PMSF), 5 mM de iodoacetamida, 1 mM clorometil cetona e leupeptina (1µg/ml). Após incubação a 4 °C por 15 min, as amostras foram centrifugadas a 10000 *x g* por 30 min. O sobrenadante foi retirado e transferido para novo tubo. O *pellet* e o sobrenadante foram estocados a -20 °C ou utilizados imediatamente para análise em gel descontínuo de poliacrilamida (SDS-PAGE) [140].

As amostras foram solubilizadas em tampão de amostra (TRIS 62 mM, pH 6,8, DTT 50 mM, SDS 0.2%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0.01%) e separadas por eletroforese em gel descontínuo de poliacrilamida a 10% contendo 0.1% de SDS com voltagem constante de 90 V. Os géis foram corados com Commassie 0.2% (p/v) em etanol, ácido acético, água (45:10:45, v/v/v) durante 2 h, depois descorados com etanol, ácido acético, água (23:7:70, v/v/v). As massas moleculares foram determinadas utilizando marcadores padrões (Bio-Rad).

Os géis que continham proteínas marcadas radioativamente foram tratados por 1 hora, com agitação, em *Amplify* (Amersham) e posteriormente secos. Os cassetes contendo os géis e o filme (Kodak) foram armazenados a -70 °C e revelados após 2 meses.

2.13 Microscopia de fluorescência

Eritrócitos infectados e não infectados foram incubados por 30 minutos com 5µM de CellRox (Molecular Probes®) ou de Image-it (Molecular Probes®), kits para avaliar estresse oxidativo e lipoperoxidação, respectivamente. Como marcador de ácidos nucleicos, adicionamos nos 5 últimos minutos da incubação o fluoróforo DAPI na concentração de 200 nM. Com outro lote de eritrócitos infectados e não infectados, fizemos o mesmo protocolo descrito com a diferença de que os que seriam marcados com CellRox foram incubados previamente por 30 minutos com H₂O₂, enquanto que os que seriam marcados com Image-it foram incubados previamente por 30 minutos com peróxido de cumeno (CumOOH). Após a incubação, as células foram lavadas três vezes com PBS e as suspensões preparadas entre lâmina e lamínula. As imagens por microscopia de fluorescência foram adquiridas em uma câmera (Axio Cam HRc, Zeiss) conectada a um microscópio óptico (aumento 100x) (Axio Imager M2, Zeiss). Os filtros fluorescentes usados foram 38 HE GFP (488/509), 02 DAPI (358/463) e 63 HE mRFP (585/608) (Ex/Em).

2.14 Análises estatísticas

A significância estatística foi determinada por análise de *t-test*, one-way ANOVA ou regressão não linear do tipo dose resposta empregando os softwares Prism 5.03 (GraphPad, USA) ou Oringin (OringinLab Corporation, USA).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Função de vitamina E em P falciparum

3.1.1 Caracterização da tocoferolquinona

A fim de demonstrar que a vitamina E, biossintetizada pelo parasita, está envolvida no sistema redox do eritrócito infectado, realizamos experimentos baseados na literatura em que se descreve o papel do α -tocoferol como um antioxidante [141].

Em plantas, já foi descrito que a adição de uma fonte de carbono orgânico resulta no aumento da atividade mitocondrial, da concentração de EROs e da produção de α -tocoferol em cloroplastos do mutante *Euglena gracilis* W14ZUL [141]. Os mesmos autores também reportaram que em culturas foto-heterotróficas da cepa selvagem de *Euglena gracilis* Z existia uma correlação positiva entre a geração de EROs e produção de α -tocoferol. Os autores concluíram que o aumento de α -tocoferol e tocoferolquinona estão atrelados à manipulação de fatores que levam à geração de EROs.

O produto da oxidação do α -tocoferol, a tocoferolquinona, não é encontrado comercialmente e por isso tivemos que realizar a oxidação de α -tocoferol para posterior padronização da análise desse produto. Utilizamos o protocolo descrito por Liebler et al. [138] descrito no item 2.4, os quais empregam a análise por RP-HPLC e GC/MS para a caracterização desses produtos.

A forma oxidada da vitamina E foi obtida a partir da oxidação do α -tocoferol e purificada por RP-HPLC, *sistema I*, item 2.7. Após a análise do perfil cromatográfico, coletamos a fração no tempo de 20 minutos, a qual foi posteriormente identificada por GC/MS como sendo a tocoferolquinona, produto da oxidação do α -tocoferol (Figura 9).



Figura 9- Caracterização por GC/MS de tocoferolquinona. Saída de dados da ferramenta de pesquisa "Qual Browser" do software Xcalibur. A tabela aponta que dos três melhores "hits", o primeiro aponta uma semelhança de quase 70% com o espectro correspondente à tocoferolquinona depositado na biblioteca do software. (A) espectro obtido da fração de RP-HPLC (*sistema 1*)que queríamos confirmar a sua identidade. (B) espectro de tocoferolquinona presente na biblioteca.

Com a análise por RP-HPLC desse produto padronizada e confirmada por espectrometria de massas, passamos para a análise do extrato de parasitas marcado radioativamente. O experimento consistiu em marcar metabolicamente a cultura de *P. falciparum* tratada com cloroquina, droga que sabidamente causa estresse por impedir a formação de hemozoína [106] ou submeter à cultura a uma tensão de 20% de O_2 . Culturas *in vitro* com 5% de parasitemia, com parasitas no estágio esquizonte, foram tratadas com 7,5 nM de cloroquina (IC₅₀ já estabelecida em nosso laboratório para a cepa 3D7) ou submetidas à uma tensão de 20% de O_2 . Parasitas sem o tratamento também foram cultivados como controle. As condições descritas acima foram mantidas 48 horas antes da análise por RP-HPLC, sendo que nas últimas 12 a 16 horas de tratamento foi feita a marcação metabólica com [³H]GGPP (Figura 10).



Figura 10- Perfil de incorporação radioativa em situação de estresse oxidativo I. Eritrócitos parasitados com formas maduras marcados metabolicamente com [³H]GGPP e tratados com a IC₅₀ de cloroquina ou cultivados a uma tensão de 20% de O₂.. Os extratos foram purificados por RP-HPLC (*sistema I*). As frações foram coletadas em intervalos de 1 ml/min. Demonstração da presença de frações

radioativas coincidentes com os padrões de α -TQ, α -tocoferolquinona; γ -T, γ -tocoferol; α -T, α -tocoferol; K1, ? não identificado.

Podemos observar que a incorporação de [³H]GGPP na fração correspondente ao tempo de retenção do γ e α -tocoferol (24 e 26 minutos, respectivamente) foi maior nas duas condições de estresse oxidativo comparados com o controle. Fato esse que já havíamos descrito na caracterização dessa vitamina. No tempo de retenção da tocoferolquinona (20 e 21 minutos), observamos que no tratamento com cloroquina tivemos um aumento de 41% e com a tensão de 20% de O₂ um aumento de 17% na incorporação do precursor.

Foi avaliada outra droga também relacionada com estresse oxidativo, a cercosporina. Essa substância está presente em um fungo patógeno de plantas da espécie *Cercospora nicotinae* e é formadora natural de oxigênio singlet ($^{1}O_{2}$) [142, 143]. Essa droga, junto à fluoresceína, já foi utilizada anteriormente para medir a formação de $^{1}O_{2}$ em *P. falciparum* [107]. Entretanto, nesse trabalho não foi descrita a IC₅₀ da cercosporina para o parasita. Foi calculada a concentração inibitória de 50% de crescimento (IC₅₀) para a droga cercosporina para nossa cultura (Figura 11).



Figura 11- Concentração inibitória de 50% de crescimento da cercosporina. Curva de crescimento doseresposta do tratamento com diferentes concentrações da droga. IC₅₀ de 177±44nM (n=3) com 48 horas de tratamento.

A IC₅₀ foi determinada com uma concentração de 177 \pm 44nM de cercosporina. Quando foi utilizada para medir a formação de ¹O₂ em *P. falciparum* [107], os autores utilizaram

concentrações na faixa de 1 a 40 nM para avaliar a formação basal do radical e não a inibição do crescimento. Contudo, a IC_{50} encontrada pelos autores foi de 200 nM (com. pess.).

Realizamos a análise para avaliar se a cercosporina iria interferir nos níveis de vitamina E e seu produto oxidado. O experimento consistiu em marcar metabolicamente de 12 a 16 horas a cultura de *P. falciparum* com [³H]GGPP tratadas com a IC₅₀ da cercosporina ou cultivar os parasitas em uma tensão de 20% de O_2 e, posteriormente, analisar por RP-HPLC a incorporação radioativa nas formas oxidadas do tocoferol (Figura 12).



Figura 12- Perfil de incorporação radioativa em situação de estresse oxidativo II. Eritrócitos parasitados com formas maduras marcados metabolicamente com [³H]GGPP e tratados com a IC₅₀ de cercosporina ou cultivados a uma tensão de 20% de O₂. Os extratos foram purificados por RP-HPLC (*sistema I*). As frações foram coletadas em intervalos de 1 ml/min. Demonstração da presença de frações radioativas coincidentes com os padrões de α -TQ, α -tocoferolquinona; γ -T, γ -tocoferol; α -T, α -tocoferol.

Nesse experimento, conseguimos detectar frações radioativas coincidentes com os tempos de retenção dos padrões de α -tocoferolquinona (19 minutos), γ e α -tocoferol (26 e 29 minutos, respectivamente). Podemos observar que houve uma maior incorporação do precursor radioativo nos tocoferóis em que a cultura foi submetida a um estresse oxidativo. A forma oxidada da vitamina E também foi detectada e conseguimos mostrar que há um aumento de α -tocoferolquinona em situações de estresse com mais uma droga relacionada com estresse oxidativo, além da cloroquina.

Como já foi descrito em vários trabalhos que existe um aumento de tocoferolquinona em situações de estresse oxidativo [144-147], esses resultados são fortes indícios de que a vitamina E, biossintetizada pelo parasita, esteja atuando na proteção contra o estresse oxidativo. Entretanto, precisávamos medir os níveis ROS para podermos afirmar esse papel do α -tocoferol no parasita.

3.1.2 Níveis de EROs e estresse oxidativo

Para fundamentar os estudos sobre o estresse oxidativo, decidimos fazer a análise por citometria de fluxo empregando os kits Image-iT® (Molecular Probes®), usado para a detecção de lipoperoxidação e CellROX® (Molecular Probes®), usado para detecção de EROs. Porém, antes das análises por citometria de fluxo, decidimos utilizar a microscopia de fluorescência para avaliar a localização e a funcionalidade dos fluoróforos (Figuras 13 e 14).



Figura 13- Avaliação por imagem do CellRox. O flouróforo não possui fluorescência quando reduzido, porém quando é oxidado exibe uma fluorescência vermelha. A cultura não desafiada com H2O2 apresentou um nível de estresse oxidativo basal tanto em eritrócitos parasitados como nos não parasitados, enquanto que a que foi desafiada apresentou um aumento na fluorescência significativo principalmente nos eritrócitos parasitados evidenciando o estresse oxidativo. Símbolos: (-) ausência; (+) presença.



Figura 14- Avaliação por imagem do Image-it. O flouróforo possui fluorescência vermelha quando reduzido, porém quando é oxidado exibe uma fluorescência verde. O nível de lipoperoxidação pode ser medido pela razão entres as fluorescências verde e vermelha. A cultura não desafiada com CumOOH apresentou um nível de estresse oxidativo basal uma vez que a cor predominante foi o vermelho tanto em eritrócitos parasitados como nos não parasitados, enquanto que a que foi desafiada apresentou uma mudança na fluorescência de verde para vermelho principalmente nos eritrócitos parasitados evidenciando a lipoperoxidação. Símbolos: (-) ausência; (+) presença.

A análise por microscopia de fluorescência nos permitiu validar os fluoróforos e analisar sua localização na célula.

Pretendíamos realizar a mesma validação dos fluoróforos utilizando a citometria de fluxo, porém as padronizações para o Image-iT não foram possíveis, pois necessitávamos de um citômetro de fluxo com feixe UV para excitação do marcador DAPI (365 nm). Como queríamos separar as populações de eritrócitos parasitados e não parasitados, essa análise ficou pendente. Por outro lado, conseguimos padronizar as análises de níveis de EROs utilizando o CellRox (Figura 15).





Figura 15- Dot Plot dos parâmetros utilizados na análise com CelLRox. Padronização para as análises por citometria de fluxo. (A) eritrócitos infectados marcados com SYTO 16 Green, (B) eritrócitos não infectados marcados com SYTO 16 Green. (C) marcação por CellRox. (D) eritrócitos não infectados marcados com SYTO 16 Green e CellRox. (E) eritrócitos infectados marcados com SYTO 16 Green e CellRox. (E) eritrócitos infectados marcados com SYTO 16 Green e CellRox. (E) eritrócitos infectados marcados com SYTO 16 Green e CellRox. (E) eritrócitos infectados marcados com SYTO 16 Green e CellRox. (E) eritrócitos infectados marcados com SYTO 16 Green e CellRox. (E) eritrócitos infectados marcados com SYTO 16 Green e CellRox. (E) eritrócitos infectados marcados com SYTO 16 Green e CellRox. (E) eritrócitos infectados marcados com SYTO 16 Green e CellRox. (E) eritrócitos infectados marcados com SYTO 16 Green e CellRox. (E) eritrócitos infectados marcados com SYTO 16 Green e CellRox. (E) eritrócitos infectados marcados com SYTO 16 Green e CellRox. (E) eritrócitos infectados marcados com SYTO 16 Green e CellRox. (E) eritrócitos infectados marcados com SYTO 16 Green e CellRox. (E) eritrócitos infectados marcados com SYTO 16 Green e CellRox. (E) eritrócitos infectados marcados com SYTO 16 Green e CellRox. (E) eritrócitos infectados marcados com SYTO 16 Green e CellRox. (E) eritrócitos infectados marcados com SYTO 16 Green e CellRox.

No método, conseguimos analisar os níveis de estresse oxidativo separadamente de eritrócitos parasitados e não parasitados, utilizando o marcador de núcleo *SYTO* 16 *Green* (Figuras15A e 15B). Classificamos a população de eritrócitos como hemácias (hem) e a de parasitas como *infected red blood cell* (IRBC). Na marcação apenas com CellRox observamos que eritrócitos com maior granulosidade apresentaram níveis basais de oxidação maiores (Figura 15C).Com a marcação dupla (Figura 15E) foi possível observar que em esquizontes (seta preta) os níveis basais de estresse oxidativo são maiores que em trofozoítas jovens, fato já descrito por Butzloff et al. [107]. A partir desse ponto, passamos a analisar apenas a população IRCB, porém desafiando previamente a cultura de parasitas com o agente oxidante



 H_2O_2 . Uma parte da cultura foi incubada com 100 nM de H_2O_2 meia hora antes das marcações com os fluoróforos (item 2.11) (Figura 16).

Figura 16- Níveis de estresse oxidativo em P. falciparum. Histogramas obtidos pelo gate IRBC. (A) níveis basais de estresse oxidativo a 0 minutos de incubação sem a adição de H₂O₂. (B) níveis de estresse oxidativo em 0, 10, 20 e 30 minutos de incubação sem a adição de H₂O₂. (C) níveis de estresse oxidativo em 0, 10, 20 e 30 minutos de incubação com a adição de H₂O₂. (D) comparação em 20 minutos de incubação entre desafiado e não desafiado com H₂O₂. Vermelho cheio: níveis basais; verde: 10 minutos; rosa: 20 minutos; azul: 30 minutos.

Obtivemos resultados interessantes com esse experimento, pois a cultura de parasita que não foi desafiada com H_2O_2 apresentou um nível basal de estresse oxidativo (Figura 16A) o qual teve sua média geométrica de fluorescência aumentada de 44,3 para 67,8 com o decorrer do tempo atingindo seu platô em 20 minutos (Figura 16B). Ao analisar a cultura que foi pré-incubada com H_2O_2 observamos que no tempo zero, o platô de fluorescência do material não desafiado já havia sido atingido, com uma média geométrica da fluorescência de 73,1, a qual aumentou para 92,2 em 20 minutos (Figura 16C). Quando comparamos o tempo 20 minutos dos dois tratamentos, podemos afirmar que a cultura de parasitas desafiada com H_2O_2 possui o nível de estresse oxidativo maior do que o não desafiado, sendo a média geométrica de fluorescência de 81,2 para o desafiado e 44,9 para o controle. (Figura 16D). Determinamos outro parâmetro que foi a adição de tocoferol na cultura que evitou o aumento dos níveis de estresse oxidativo em ambas as condições (dados não apresentados).

Os resultados das análises das amostras tratadas e não tratadas com ácido úsnico e desafiadas com H_2O_2 estão representadas na Figura 17.



Figura 17- Níveis de estresse oxidativo em eritrócitos infectados por *P. falciparum*. Análise por citometria de fluxo de eritrócitos infectados por *P. falciparum* desafiados (H₂O₂) ou não desafiados (basal) com o pró-oxidante H₂O₂. Os níveis de estresse oxidativo foram avaliados em diferentes tratamentos como C, controle; Au, ácido úsnico; T, α-tocoferol e AUT, ácido úsnico mais α-tocoferol (n=6).

Podemos observar que os níveis de estresse oxidativo nos tratamentos não desafiados com H₂O₂ (basal) não apresentaram diferença significativa quando comparados entre eles (p>0,05). Quando desafiados com o pró-oxidante (H₂O₂), detectamos um aumento significante nos níveis de estresse oxidativo na cultura tratada com ácido úsnico (H₂O₂ AU), quando comparada com a cultura não tratada e desafiada (H₂O₂ C) (p<0,05). Do mesmo modo que conseguimos recuperar o crescimento do parasita quando tratamos com ácido úsnico e adicionamos α -tocoferol exógeno [43], os níveis de estresse oxidativo também diminuem significativamente ao adicionar vitamina E em culturas tratadas com AU e desafiadas com H₂O₂ (H₂O₂ AUT) quando comparadas com culturas onde não adicionamos o α -tocoferol (H₂O₂ AU) (p<0,05).

Mostramos que o tratamento com ácido úsnico de eritrócitos infectados causa um aumento nos níveis de EROs. Esse fato, somado ao resultado que existe um aumento nos níveis de vitamina E e tocoferolquinona em eritrócitos infectados tratados com cloroquina ou cercosporina, nos permite afirmar que a vitamina E biosintetizada pelo parasita participa do sistema redox presente no eritrócito infectado.

3.2 Biossíntese de Filoquinona

3.2.1 Caracterização da biossíntese de filoquinona

Resultados anteriores da caracterização bioquímica da biossíntese de tocoferol empregando [³H]GGPP como precursor radioativo, identificamos uma fração radioativa coincidente com o tempo de retenção do padrão de filoquinona. Outros resultados utilizando [³H]pirofosfato de farnesila ([³H]FPP) também apontavam a presença dessa vitamina. Para a confirmação dessa biossíntese, decidimos utilizar um terceiro precursor, [³H]fitil-PP, precursor direto da biossíntese das vitaminas E e K1.

Primeiramente, foi padronizada a marcação metabólica empregando [³H]fitil-PP. A adição de fitil-PP não causou inibição de crescimento ou desenvolvimento do parasita. A marcação metabólica consistiu em incubar os parasitas em cultura na presença de [³H]Fitil-PP e, posteriormente, as formas intraeritrocíticas maduras foram separadas por meio de coluna magnética. A Figura 18 apresenta o perfil de incorporação radioativa.



Figura 18- Perfil de incorporação radioativa de [³H]fitil-PP em *P. falciparum*. Eritrócitos parasitados com formas maduras marcados metabolicamente com [³H]fitil-PP foram submetidos à extração com

hexano. Os extratos foram purificados por *RP-HPLC* (*Sistema II*). Demonstração da presença de frações radioativas coincidentes com os padrões de γ -T, γ -tocoferol; α -T, α -tocoferol; K1, filoquinona; ?, não identificado.

Utilizando como precursor [³H]fitil-PP, conseguimos detectar uma fração radioativa coincidente com o tempo de retenção dos padrões comerciais das vitaminas E e K1. Esse resultado, somado com resultados preliminares onde os precursores empregados foram o [³H]GGPP e [³H]FPP, é um forte indício de que a biossíntese de vitamina K1 ocorra no parasita.

Para mostrar a presença da estrutura química de vitamina K1, empregamos a técnica de espectrometria de massas para a análise da fração purificada por RP-HPLC correspondente ao tempo de retenção dessa vitamina. Extratos de 10^{10} eritrócitos parasitados e quantidades equivalentes de eritrócitos não parasitados e meio de cultura foram analisados. Ressuspendemos essas frações já secas em 30 µl de clorofórmio:metanol (1:1, v/v), contendo 2 mM de iodeto de lítio e injetamos por infusão direta no ESI-Probe, utilizando o sistema de pressão OMNIFIT, em um fluxo de 10 µL/min [148]. Todos os espectros foram adquiridos em modo positivo e as condições utilizadas foram: voltagem do *spray* 4,52 kV, voltagem do capilar 17 V e temperatura do capilar 250 °C (Figura 19).



Figura 19- Detecção da estrutura química da filoquinona por espectrometria de Massas. Foram analisadas as frações correspondentes ao tempo de retenção da vitamina K1 de três extratos diferentes. (A) padrão de vitamina K1; (B) eritrócitos infectados; (C) eritrócitos não infectados; (D) meio de cultura. Os espectros obtidos nas amostras foram comparados com o do padrão de filoquinona.

Na análise do padrão de vitamina K1, identificamos o íon m/z 456 correspondente a [M+Li] e o íon *m/z* 439 correspondente à $[M+Li-H_2O]^+$. Como produtos de sua quebra, identificamos os íons m/z 204, m/z 221 e m/z 245 (Figura 19A). O mesmo perfil foi detectado nas frações purificadas de eritrócitos parasitados (Figura 19B), porém estava ausente nos eritrócitos não infectados e em meio de cultura (Figuras 19C e 19D). Estes resultados nos sugerem que a presença dessa vitamina é inerente à presença do parasita. Mesmo não sendo biossitetizada pelo ser humano, a vitamina K1 pode estar presente na corrente sanguínea, dependendo da dieta, sendo transportada por lipoproteínas plasmáticas [149]. Uma vez que separamos o plasma dos eritrócitos que são usados na cultura e usamos AlbuMAX como fonte de aminoácidos, provavelmente a quantidade de filoquinona nos eritrócitos está depletada e por isso não a detectamos nos eritrócitos não infectados.

Para complementar a caracterização bioquímica da biossíntese de filoquinona, analisamos a biossíntese e a presença do intermediário fitil-PP. Fizemos marcações metabólicas com [³H]GGPP e identificamos por RP-HPLC a presença de fitil-PP radioativo (Figura 20).



Figura 20- Perfil de incorporação radioativa [³H]GGPP em *P. falciparum*. Eritrócitos parasitados com formas maduras marcados metabolicamente com [3H]GGPP foram submetidos à extração com hexano. Os extratos foram purificados por RP-HPLC (*Sistema III*). Demonstração da presença de uma fração radioativa coincidente com o padrão de fitil-PP.

Por meio da marcação metabólica com [³H]GGPP, foi possível detectar um composto radioativo com o mesmo tempo de retenção do padrão de fitil-PP. Além disso, analisamos extratos não radioativos de parasitas por TLC e espectrometria de massas para a identificação da estrutura química da molécula. A identificação desse precursor é essencial para fundamentar a biossíntese das vitaminas E e K1, uma vez que todos os precursores provenientes da via MEP dessas vitaminas estarão caracterizados no parasita.

Conseguimos otimizar a análise de fitil-PP por infusão direta em um triploquadrupolo modelo Accela TSQ Quantum Max. A ionização foi feita por APCI com a voltagem do *spray* de 3.5 kV. O íon correspondente à $[M^+]$ foi o m/z 455 e sua quebra foi feita com uma pressão de colisão de 1,6 mTorr. Como produto dessa quebra, os íons m/z 438, m/z 180 e m/z 160 foram observados e selecionados para caracterização do fitil-PP no método de análise tipo

SRM (Selected reaction monitoring). Com os parâmetros no espectrômetro de massas padronizados, passamos para a análise por LC-MSMS. Foi empregada uma coluna C18 e como fase móvel metanol 0,1% de ácido fórmico com um fluxo de 0,2 mL/min.

Nesse ponto, deparamos com um obstáculo que foi a resolução cromatográfica. Por ser um composto fosforilado, o fitil-PP é melhor resolvido por cromatografia por troca iônica e interação hidrofóbica. Como o sistema que temos à disposição, no departamento, é composto por uma coluna de fase reversa, C18, com um tampão ácido, não conseguimos resolver por LC-MSMS o fitil-PP. Expusemos o problema ao técnico do equipamento do CEFAP (Centro de Facilidades de Apoio à Pesquisa) e sugerimos um sistema que emprega um sistema de gradiente linear com bicarbonato de sódio (NaHCO₃) 25 mM e acetonitrila (*Sistema III*). Contudo, fomos informados que tampões com sal não poderiam ser usados no equipamento a fim de evitar problemas como contaminação e interferência nas análises.

Conseguimos resolver essa questão fazendo uma purificação prévia por TLC de extratos de eritrócitos infectados como descrito por Ischibeck et al. [73]. Raspamos a sílica na altura do R*f* do padrão de fitil-PP, fizemos a extração com hexano e analisamos por infusão direta em um micrOTOF-QII (Figura 21).



Figura 21- Análise de espectrometria de massas de fitil-PP. Os espectros foram obtidos de bandas de TLC recuperadas das amostras com o mesmo R*f* do padrão de fitil-PP. (A) Padrão de fitil-PP, (B) eritrócitos infectados (C) eritrócitos não infectados. Íons: [M]⁻ m/z 455,23 e [M+Na]⁻ m/z 477,21.

As análises por espectrometria de massas das bandas com o mesmo R*f* do fitil-PP purificadas por TLC permitem afirmar que a estrutura química do fitil-PP está presente nos eritrócitos infectados e ausente nos não infectados. Conseguimos detectar em eritrócitos infectados o íon m/z 455,23, correspondente à [M]⁻ com o erro de 3 p.p.m e com o mesmo perfil isotópico do padrão. Foi possível detectar o aduto com sódio [M+Na]⁻, porém com um erro maior pelo fato de apresentar uma menor abundância.

Passamos a procurar possíveis funções para a filoquinona em *P. falciparum*. Em plantas, a filoquinona está relacionada com transporte de elétrons no fotossistema I [93]. Recentemente foram levantadas outras hipóteses de funções para a filoquinona em plantas, além de transportadora de elétrons. Foi detectada a forma reduzida da vitamina K1, a hidrofiloquinona, em menores quantidades em folhas de *Arabidopsis* mantidas sob luz, quando comparadas com as que foram mantidas no escuro. Os autores sugerem que a hidrofiloquinona provavelmente não esteja relacionada com o *pool* fotoativo de filoquinona e que esteja envolvida na clororespiração [94]. Outros estudos mostram que aproximadamente 50% do total de filoquinona não está associada ao fotossistema I [72, 95]. Com base nesses dados, passamos a investigar a presença de filoquinona reduzida em *P. falciparum*. O objetivo foi verificar se a filoquinona biossintetizada pelo *P. falciparum* pode ser encontrada na forma reduzida por meio de marcações metabólicas com precursores radioativos.

3.2.2 Caracterização de hidrofiloquinona

A princípio, precisávamos ter a forma reduzida da filoquinona para que nós pudéssemos padronizar sistemas de RP-HPLC que separassem a hidrofiloquinona de outros produtos que também utilizam o precursor radioativo empregado na marcação metabólica. Esse composto não é vendido comercialmente e tentamos sintetizá-lo segundo descrito por Oostende et al. [94]. Entretanto, não obtivemos sucesso em caracterizar o produto por espectrometria de massas. Entramos em contato com o grupo do Prof^o Massuo Jorge Kato, Instituto de Química da USP, e em colaboração conseguimos sintetizar a hidrofiloquinona e estabilizá-la metilando as hidroxilas. As técnicas utilizadas e resultados estão no manuscrito submetido ao *Journal of Chromatograph* B (Anexo III). Com o padrão de hidrofiloquinona metilada, padronizamos o *Sistema II* de RP-HPLC (descrito no item 2.7) e analisamos o extrato de eritrócitos infectados e não infectados metilados (Figura 22).



Figura 22- Perfil de incorporação radioativa de [³H]fitil-PP em *P. falciparum*. As amostras foram analisadas por RP-HPLC (*Sistema II*). Demonstração da presença de frações radioativas coincidentes com os padrões de α-T, α-tocoferol; KH₂ meO, hidrofiliquinona metilada e K1, filoquinona.

Podemos observar na marcação metabólica com [3H]fitil-PP e posterior metilação do extrato de parasitas a presença de frações radioativas com o tempo de retenção correspondente aos padrões de α -tocoferol, hidrofiliquinona metilada e filoquinona. O mesmo não ocorreu quando analisamos eritrócitos não infectados. A presença da forma reduzida da filoquinona é um forte indício de que essa vitamina esteja participando de processos de oxirredução e/ou transporte de elétrons, uma vez que a forma reduzida é descrita como responsável por essas atividades [93, 94, 96].

O *P. falciparum* será o primeiro organismo a possuir as vias metabólicas ativas para a biossíntese das vitaminas K1 e K2, o que implica no surgimento de alguns questionamentos que não podem ser ignorados. Até o momento, se conhece que plantas, algas e cianobactérias são capazes de biossintetizar a vitamina K1 [150], enquanto que a vitamina K2 é biossintetizada por bactérias [151].

Cientes das possíveis funções já descritas para a vitamina K1 e seus produtos, fica a questão: por que e para que propósito esse composto é biossintetizado por *P.falciparum*?

Podemos dizer hoje que, a filoquinona não tem mais como única e exclusiva função o transporte de elétrons no fotossistema I em plantas [93] e cofatores em vertebrados [96]. Em relação ao *P. falciparum*, a vitamina K1 nos abre diversas opções de investigação.

Um destino seria a participação da filoquinona na regulação do *pool* de menaquinona, já que a vitamina K1 pode ser convertida em menaquinona [152] e o parasita utiliza essa vitamina no transporte de elétrons da cadeia respiratória [42]. Porém, em *P. falciparum*, a transformação de filoquinona para menaquinona é pouco provável. Foi caracterizado o intermediário da via de menaquinona, a hidroximetilmenaquinona, pela estudante de doutorado Heloisa Berti Gabriel (dados não publicados).

Outra questão seria verificar se a filoquinona que o parasita biossintetiza está envolvida em sistemas redox, como mostrado em *Arabdopsis*, que a forma reduzida da vitamina provavelmente esteja relacionada com a clororespiração [94]. Outros mostram que 50% do total de filoquinona não está associada ao fotossistema I e provavelmente participe do sistema antioxidante [72, 95].

Uma vez que a filoquinona possui funções relacionadas a mecanismos de coagulação do sangue [98] e o *Plamodium sp* parasita glóbulos vermelhos, não podemos descartar algum papel da vitamina K1 no ciclo intraeritrocítico. Principalmente quando falamos sobre a forma grave da doença, a malária cerebral, que ocorre o sequestro de eritrócitos parasitados em capilares profundos causando hipóxia, inflamação, desmielinação e ativação de plaquetas [153-156].

A forma reduzida da filoquinona precisa estar presente para participar do sistema antioxidante [72, 95] e como cofator para carboxilases [96]. Como co-produto dessas atividades, forma-se a filoquinona totalmente oxidada, a epoxi filoquinona, forma que é biologicamente inativa. Para acontecer a reciclagem da vitamina K1, a enzima VKOR reduz a forma epoxi em filoquinona e depois em hidrofiloquinona [99]. Uma vez que foi mostrado que o ciclo da vitamina K1 pode ser inibido pela warfarina [100-102], estudos sobre os mecanismos de ação dessa droga e sobre a enzima VKOR em *P. falciparum* podem ser promissores na a identificação de um novo alvo para o desenvolvimento de antimaláricos.

Poderemos verificar se a filoquinona serve como fonte de fitol, o qual pode ser reciclado na biossíntese de vitamina E e K1, ligado a ácidos graxos ou participar de mudanças pós-traducionais, assim como ocorre em *Arabidopsis* [73], porém essa questão será discutida no item 3.3.2.

3.3 Via de reaproveitamento de fitol em P. falciparum

Em resultados anteriores do nosso grupo foi detectado um composto radioativo com o mesmo R*f* do padrão de fitol em análises por TLC de extratos de eritrócitos infectados marcados com [3 H]IPP. Entretanto, sua caracterização não foi aprofundada na época (dados não publicados). Com a caracterização da biossíntese de vitamina E e a presença de filoquinona, voltamos nossas atenções para o fitol.

3.3.1 Biossíntese de vitamina E e K1

Foi identificado em *Arabidopsis* um cDNA que codifica a enzima gerenilgeranil redutase, responsável pela redução do GGPP livre ou ligado à clorofila em fitil-PP [70]. Sabese que, durante a senescência, a clorofila é clivada pela enzima clorofilase o que resulta na formação de clorofilídeos e fitol [157]. O fitol é presumivelmente degradado por α - e β -oxidação, tal como descrito nos animais, onde é oxidado nos periossomos e mitocôndrias [158]. Em *Arabidopsis*, quantidades elevadas de fitanoil-CoA, um produto da oxidação do fitol, foi encontrado em mutantes *etfqo*, indicando a presença de vias de oxidação semelhantes em plantas [158].

Furuya et al. [159] sugeriram uma segunda via de biossíntese de fitil-PP independente do GGPP. Ao disponibilizar fitol livre em culturas de células de cártamo (*Carthamus tinctorius*), observou-se um aumento na biossíntese de tocoferol [159]. Ischebeck et al. [73] mostraram que *Arabidopsis* é capaz de incorporar [³H]fitol em clorofila, tocoferol e ésteres fitilados de ácidos graxos. Também houve a incorporação na vitamina K1, porém em menor quantidade. Os autores sugeriram que a maior parte do fitol livre seria direcionado para o sistema antioxidante ao invés de participar da formação de clorofila, uma vez que na senescência o aparato fotossintetizante não está operante e existe um aumento do estresse oxidativo [73].

Com base nessas informações, fizemos marcações metabólicas com [³H]Fitol para avaliar se ele poderia ser incorporado novamente às vitaminas E e K1 em *P. falciparum*. O perfil de incorporação radioativa pode ser observado na Figura 23.



Figura 23- Perfil de incorporação radioativa de [³H]fitol em *P. falciparum*. Eritrócitos parasitados com formas maduras marcados metabolicamente com [³H]fitol foram submetidos à extração com hexano. Os extratos foram purificados por RP-HPLC (*Sistema II*). Demonstração da presença de frações radioativas coincidentes com os padrões de α-T, α-tocoferol; γ-T, γ-tocoferol; K1, filoquinona; ?, não identificado.

O parasita foi capaz de incorporar o [³H]fitol nas vitaminas E e K1, uma vez que observamos picos radioativos coincidentes com o mesmo tempo de retenção do padrão dessas vitaminas. A incorporação de fitol livre nessas vitaminas foi recentemente mostrada em *Arabidopsis sp.* como uma forma de reaproveitamento desse composto [73]. Foi observado que a incorporação foi maior na vitamina E que na filoquinona, o que também aconteceu com *Arabidopsis* [73]. Pode estar ocorrendo o mesmo fenômeno sugerido pelo grupo citado que seria um direcionamento do fitol para a biossíntese de tocoferol preferencialmente. Entretanto, para haver esse reaproveitamento para biossíntese das vitaminas, o fitol tem que sofrer duas fosforilações para a formação de fitil-PP.

Passamos a investigar *in vitro*, em colaboração com a aluna de mestrado Danielle Vega, se extratos proteicos de eritrócitos infectados e não infectados possuíam a capacidade de fosforilar o [³H]fitol em [³H]fitil-PP por meio de análises por TLC e RP-HPLC. Foram analisados extrato solúvel (fração citosólica) e extrato insolúvel (fração membranar) e em ambos foi detectada uma fração radioativa coincidente com o tempo de retenção do padrão de fitil-PP, apontando que o parasita possui a maquinaria para fosforilar o fitol. Cabe salientar que, no extrato insolúvel, o [³H]fitol foi quase todo fosforilado formando o [³H]fitil-PP (dados não publicados). Fenômeno que também ocorreu com *Arabidopsis* e *Synechocystis* onde a atividade fitol quinase foi encontrada nos extratos proteicos de membrana [160]. Para complementar esses resultados sobre a fosforilação do fitol, a aluna Danielle Vega analisou por RP-HPLC extratos de eritrócitos parasitados marcados metabolicamente com [³H]fitol e foi detectada uma fração radioativa com o mesmo tempo de retenção do padrão de fitil-PP, mostrando *in vivo* a fosforilação de [³H]fitol (dados não publicados).

3.3.2 Caracterização da presença de fitol em P. falciparum

Para complementar os dados das marcações metabólicas, caracterizamos por espectrometria de massas empregando um LC-MS/MS a presença da estrutura química de fitol em quantidades equivalentes de eritrócitos infectados, não infectados e meio de cultura (Figura 24).



Figura 24- Análise por LC-MSMS de fitol. Cromatogramas foram obtidos por LC-MSMS em uma coluna C18 com um sistema isocrático de metanol 0,1% ácido fórmico com um fluxo de 0,2 mL/min. Foram analisados dois extratos diferentes. Linha preta: padrão de fitol; linha vermelha: parasitas; linha verde: eritrócitos não infectados. Os espectros obtidos nas amostras foram comparados com o do padrão de fitol.

Não foi possível detectar fitol em meio de cultura. Conseguimos detectar a estrutura química de fitol nos extratos de eritrócitos infectados e não infectados. Em eritrócitos não infectados foi possível fazer a quantificação de fitol e encontramos uma concentração de 50ng/mL. Entretanto, na amostra de eritrócitos infectados não foi possível fazer a quantificação de um composto (Figura 24). O que nos chamou atenção na análise foi que o padrão de fitol é na verdade uma mistura de isômeros *cis* e *trans*-fitol, sendo a forma *trans* de ocorrência natural e a forma *cis* descrita como artefato

proveniente do refino de óleo vegetal [161]. Em análises por GC-MS/MS, é possível resolver os dois isômeros, enquanto que, nas análises por LC-MS/MS, os isômeros coeluem. Suspeitamos de que o composto que impossibilitou a quantificação de fitol em eritrócitos infectados poderia ser um isômero com uma concentração diferente da encontrada no padrão de fitol. Por isso, analisamos a mesma amostra por GC-MS/MS (Figura 25).



Figura 25- Análise por GC-MSMS dos isômeros de fitol. Cromatogramas foram obtidos em por GC-MSMS com uma condição inicial de 70 °C com uma rampa de 15 °C/min até 280 °C. A temperatura do injetor foi de 200 °C e a linha de transferência a 275 °C. Foram analisados dois extratos diferentes. (A) padrão de fitol; (B) eritrócitos infectados; (C) eritrócitos não infectados. Os espectros obtidos nas amostras foram comparados com o do padrão de fitol.

Podemos observar que na análise do padrão de fitol (Figura 25A) aparecem dois picos, 15,9 e 16,1 minutos e segundo Vetter et al. [161], o *cis*-fitol é menos abundante que o *trans*fitol, assumimos que o pico em 15,9 minutos é o *cis*-fitol e o pico em 16,1 minutos é o *trans*fitol. Em contrapartida, detectamos apenas um isômero presente nas amostras, justamente o correspondente ao *cis*-fitol (Figuras 25B e 25C). Pela área do pico também é possível determinar que em parasitas (Figura 25B) temos quase 20 vezes mais *cis*-fitol, quando comparamos aos eritrócitos não parasitados. Até o momento não repetimos as análises, mas seria interessante aprofundar os estudos sobre os isômeros de fitol para determinar se, diferente de plantas, em *P. falciparum* o isômero mais abundante seria a forma *cis* ou se é apenas um artefato da manipulação do composto, assim como ocorre no refino de óleo de plantas [161].

Uma vez mostrado que o fitol é reaproveitado para a biossíntese das vitaminas E e K1 em *P. falciparum*, a ocorrência de sua fosforilação usando extratos de parasitas e a caracterização da estrutura química em eritrócitos infectados, surgiu o questionamento de qual seria sua origem. Segundo a literatura, a principal fonte de fitol é a hidrólise de clorofila [157]. O parasita não é capaz de biossintetizar a clorofila, porém biossintetiza tocoferol e filoquinona. Ambas as vitaminas possuem uma cadeia lateral de fitil-PP e poderiam ser responsáveis pela liberação de fitol.

Na biossíntese de α -tocoferol, a cadeia lateral sofre uma ciclização onde a enzima tocoferol ciclase (TC) adiciona um segundo anel contendo um oxigênio, chamado anel de cromanol, entre a junção da porção aromática com a cadeia de fitil-PP [162]. Esse anel é aberto quando a vitamina E exerce sua função como antioxidante, formando o radical de tocoferoxila e a tocoferolquinona. Na década de 50, foi mostrado em urina de coelhos o ácido α -tocoferônico e α -tocoferolactona [163, 164], os quais mais tarde passaram a ser chamados de metabólitos de Simon e foram relacionados com o metabolismo de α -tocoferolquinona. Contudo, Dutton et al. [165] mostraram que essa degradação da cadeia de fitil-PP não ocorre de maneira controlada apenas na ligação C-H no carbono 3', pois detectaram intermediários com cadeias laterais com diferentes tamanhos.

Durante décadas, os metabólitos de Simon foram considerados os únicos metabólitos de α -tocoferol presentes na urina. Em 1995, Schultz et al. [166] detectaram o que seria um novo produto do metabolismo do α -tocoferol em urina de coelho, o 2,5,7,8-tetrametil-2-(29-carboxietil)-6-hidroxicromanol (α -CEHC). Esse composto possuía o anel de cromanol intacto, apontando que era produto da degradação do α -tocoferol e não da α -tocoferolquinona. Para investigar porque Simon e seus colaboradores não detectaram o α -CEHC, Schultz et al. [166] avaliaram o processamento da amostra. Eles mostraram que, se as amostras não fossem manuseadas em atmosferas de argônio ou nitrogênio, não seria possível detectar o α -CEHC e sim a α -tocoferolactona. Os autores sugeriram que os metabólitos de Simon não poderiam ser mais utilizados como parâmetro de atividade antioxidante da vitamina E, uma vez que poderiam ser formação de α -CEHC é necessária a β -oxidação da cadeia lateral [167], assim como para a formação dos metabólitos de Simon. Podemos concluir, que no metabolismo da

vitamina E, tanto na formação dos metabólitos de Simon quanto na formação de α -CEHC o fitol não é liberado.

Por outro lado, como já foi citado, pode ocorrer a transformação de filoquinona em menaquinona. A princípio, o que poderia acontecer seria a redução da cadeia saturada de fitil, ligada à filoquinona, em GGPP ou a remoção completa da cadeia fitil-PP, seguida pela prenilação do anel com GGPP. Foi mostrado que ocorre a segunda opção alimentando ratos com filoquinona duplamente marcada com ³H no anel e ¹⁴C na cadeia isoprênica, detectaram menaquinona marcada radioativamente com ³H [168]. Para confirmar que ocorria a remoção da cadeia fitil, foi utilizada filoquinona marcada especificamente nas posições 1' e 2' da cadeia isoprênica e foi detectado ácido fitânico radioativo, produto da oxidação do fitol, comprovando que a hidrólise da filoquinona pode liberar fitol [169].

Com base no que foi descrito acima, sugerimos que o fitol presente em eritrócitos infectados por *P. falciparum* pode ter origem a partir da filoquinona. Entretanto, tornam-se necessários estudos para validar essa hipótese.

3.3.3 Fitilação de proteínas

Para avaliarmos se ocorre a fitilação de proteínas, foram realizadas marcações metabólicas com [³H]fitol e [³H]fitil-PP, separadamente, na cultura de *P. falciparum*. Após a extração das proteínas totais, tanto o sobrenadante quanto o sedimento foram submetidos à eletroforese na presença de SDS (SDS-PAGE). Para visualizarmos as proteínas que foram marcadas radioativamente, os géis foram secos e expostos em filme fotográfico por um período de 2 meses. A Figura 26 mostra as bandas radioativas proteínas marcadas utilizando como precursores [³H]fitol e [³H]fitil-PP.



Figura 26- Autoradiografia de extratos totais de *P. falciparum*. Parasitas marcados com [³H]fitol (A) e [³H]fitil-PP (B). As proteínas totais foram extraídas na forma de esquizonte. 1-2: sobrenadante; 3: sedimento.

Nas marcações com [³H]fitol e com [³H]fitil-PP foi possível observar bandas de proteínas marcadas radioativamente entre 25 e 40 e em 10 kDa somente no sobrenadante. No entanto, precisamos mostrar que o composto radioativo detectado na radiografia é realmente o fitol. Para isso, seria necessário marcar os parasitas, cortar as bandas marcadas e hidrolisar as proteínas para a liberação dos lipídeos. Após esse processo, seria possível identificar o isoprenóide envolvido nessa modificação pós traducional. Devemos ressaltar que, a maioria dos isoprenóides envolvidos na isoprenilação de proteínas são clivados por meio de uma hidrólise alcalina [76]. Entretanto, quando se trata de GGPP, FPP e fitil-PP a hidrólise com iodeto de metano é mais eficaz na liberação desses compostos [75]. Portanto, seria necessário realizar esses dois tipos de hidrólises para identificar se o fitol participa de mudanças póstraducionais em *P. falciparum*.

4 CONCLUSÕES

1. A vitamina E biossintetizada por *P. falciparum* atua no sistema redox do parasita, controlando os níveis de EROs no eritrócito infectado.

2. A biossíntese de vitamina K1 é ativa em P. falciparum.

3. A via de reaproveitamento de fitol para a biossíntese de vitamina E e K1 é ativa em *P*. *falciparum*.

REFERÊNCIAS
REFERÊNCIAS^{*}

- 1. Camargo EP. *Malária, maleita, paludismo*. Ciência e Cultura. 2003;55(1):26-9.
- 2. Coluzzi M, Corbellini G, and Celli A. [*The malariology centenary (1898-1998)*. *1898*]. Parassitologia. 1998;40(4):361-76.
- 3. Trager W and Jensen JB. *Human malaria parasites in continuous culture*. Science. 1976;193(4254):673-5.
- 4. Rey L. *Parasitologia*. 2. ed. Rio de janeiro: Guanabara Koogan; 1991. 731 p.
- 5. Menard R. *The journey of the malaria sporozoite through its hosts: two parasite proteins lead the way.* Microbes Infect. 2000;2(6):633-42.
- 6. World Health Organization. *World Malaria Report*. Geneva: WHO Press; 2014. 242 p.
- 7. Breman JG. *The ears of the hippopotamus: manifestations, determinants, and estimates of the malaria burden.* Am J Trop Med Hyg. 2001;64(1-2 Suppl):1-11.
- 8. Greenwood BM et al. *Malaria*. Lancet. 2005;365(9469):1487-98.
- 9. Suh KN, Kain KC, and Keystone JS. *Malaria*. Cmaj. 2004;170(11):1693-702.
- 10. Moorthy VS, Good MF, and Hill AV. *Malaria vaccine developments*. Lancet. 2004;363(9403):150-6.
- 11. Polley SD, McRobert L, and Sutherland CJ. *Vaccination for vivax malaria: targeting the invaders*. Trends Parasitol. 2004;20(3):99-102.
- 12. World Health Organization. *Guidelines for the treatment of malaria*. 3. ed. Geneva: WHO Press; 2015. 316 p.

^{*} De acordo com: International Commitee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedial Journal: sample references. Available from: http://www.icmje.org [2007 May 22].

- 13. Ekland EH and Fidock DA. *In vitro evaluations of antimalarial drugs and their relevance to clinical outcomes.* Int J Parasitol. 2008;38(7):743-7.
- 14. Barnes KI et al. Increased gametocytemia after treatment: an early parasitological indicator of emerging sulfadoxine-pyrimethamine resistance in falciparum malaria. J Infect Dis. 2008;197(11):1605-13.
- 15. Hogh B et al. *The differing impact of chloroquine and pyrimethamine/sulfadoxine upon the infectivity of malaria species to the mosquito vector.* Am J Trop Med Hyg. 1998;58(2):176-82.
- 16. Robert V et al. Gametocytemia and infectivity to mosquitoes of patients with uncomplicated Plasmodium falciparum malaria attacks treated with chloroquine or sulfadoxine plus pyrimethamine. Am J Trop Med Hyg. 2000;62(2):210-6.
- 17. Handunnetti SM et al. *Features of recrudescent chloroquine-resistant Plasmodium falciparum infections confer a survival advantage on parasites and have implications for disease control.* Trans R Soc Trop Med Hyg. 1996;90(5):563-7.
- 18. Price R et al. *Risk factors for gametocyte carriage in uncomplicated falciparum malaria*. Am J Trop Med Hyg. 1999;60(6):1019-23.
- 19. de Roode JC et al. *Host heterogeneity is a determinant of competitive exclusion or coexistence in genetically diverse malaria infections.* Proc Biol Sci. 2004;271(1543):1073-80.
- 20. Molyneux DH et al. *Transmission control and drug resistance in malaria: a crucial interaction.* Parasitol Today. 1999;15(6):238-40.
- 21. Hetzel MW et al. Decreased availability of antimalarials in the private sector following the policy change from chloroquine to sulphadoxine-pyrimethamine in the Kilombero Valley, Tanzania. Malar J. 2006;5:109.
- 22. Yoshikawa M et al. *Pyridinium cationic-dimer antimalarials, unlike chloroquine, act selectively between the schizont stage and the ring stage of Plasmodium falciparum.* Bioorg Med Chem. 2008;16(11):6027-33
- 23. Levander OA and Ager AL, Jr. *Malarial parasites and antioxidant nutrients*. Parasitology. 1993;107Suppl:S95-106.
- 24. D'Alexandri FL et al. *Protein dolichylation in Plasmodium falciparum*. FEBS Lett. 2006;580(27):6343-8.

- 25. Kawazu S et al. Roles of 1-Cys peroxiredoxin in haem detoxification in the human malaria parasite Plasmodium falciparum. Febs J. 2005;272(7):1784-91.
- 26. Kimura EA et al. *N-linked glycoproteins are related to schizogony of the intraerythrocytic stage in Plasmodium falciparum.* J Biol Chem. 1996;271(24):14452-61.
- 27. Seeber F. *Biosynthetic pathways of plastid-derived organelles as potential drug targets against parasitic apicomplexa*. Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord. 2003;3(2):99-109.
- 28. Roberts CW et al. *The shikimate pathway and its branches in apicomplexan parasites.* J Infect Dis. 2002;185Suppl1:S25-36.
- 29. Roberts F et al. *Evidence for the shikimate pathway in apicomplexan parasites*. Nature. 1998;393(6687):801-5.
- 30. Ralph SA et al. *Tropical infectious diseases: metabolic maps and functions of the Plasmodium falciparum apicoplast.* Nat Rev Microbiol. 2004;2(3):203-16.
- 31. Woodard CL et al. Oxindole-based compounds are selective inhibitors of Plasmodium falciparum cyclin dependent protein kinases. J Med Chem. 2003;46(18):3877-82.
- 32. Go ML. Novel antiplasmodial agents. Med Res Rev. 2003;23(4):456-87.
- 33. Eisenreich W et al. *Biosynthesis of isoprenoids via the non-mevalonate pathway*. Cell Mol Life Sci. 2004;61(12):1401-26.
- 34. Couto AS et al. Active isoprenoid pathway in the intra-erythrocytic stages of *Plasmodium falciparum: presence of dolichols of 11 and 12 isoprene units.* Biochem J. 1999;341 (Pt 3):629-37.
- 35. de Macedo CS et al. *Characterization of the isoprenoid chain of coenzyme Q in Plasmodium falciparum.* FEMS Microbiol Lett. 2002;207(1):13-20.
- 36. Cassera MB et al. *The methylerythritol phosphate pathway is functionally active in all intraerythrocytic stages of Plasmodium falciparum.* J Biol Chem. 2004;279(50):51749-59.

- 38. Moura IC et al. *Limonene arrests parasite development and inhibits isoprenylation of proteins in Plasmodium falciparum*. Antimicrob Agents Chemother. 2001;45(9):2553-8.
- 39. Rodrigues Goulart H et al. *Terpenes arrest parasite development and inhibit biosynthesis of isoprenoids in Plasmodium falciparum*. Antimicrob Agents Chemother. 2004;48(7):2502-9.
- 40. Tonhosolo R et al. *Identification, molecular cloning and functional characterization of an octaprenyl pyrophosphate synthase in intra-erythrocytic stages of Plasmodium falciparum.* Biochem J. 2005;392(Pt 1):117-26.
- 41. Tonhosolo R et al. *Carotenoid biosynthesis in intraerythrocytic stages of Plasmodium falciparum.* J Biol Chem. 2009;284(15):9974-85.
- 42. Tonhosolo R et al. Intraerythrocytic Stages of Plasmodium falciparum Biosynthesize Menaquinone. FEBS Lett. 2010;584(23):4761-8.
- 43. Sussmann RA et al. Intraerythrocytic stages of Plasmodium falciparum biosynthesize vitamin E. FEBS Lett. 2011;585(24):3985-91.
- 44. van Dooren GG, Stimmler LM, and McFadden GI. *Metabolic maps and functions of the Plasmodium mitochondrion*. FEMS Microbiol Rev. 2006;30(4):596-630.
- 45. Yeh E and DeRisi JL. Chemical rescue of malaria parasites lacking an apicoplast defines organelle function in blood-stage Plasmodium falciparum. PLoS Biol. 2011;9(8):e1001138.
- 46. Michal G. *Biochemical Pathways, An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology.* 1. ed. New York: John Wiley & Sons; 1999. 277 p.
- 47. Aejmelaeus R et al. Ubiquinol-10 and total peroxyl radical trapping capacity of LDL lipoproteins during aging: the effects of Q-10 supplementation. Mol Aspects Med. 1997;18 Suppl:S113-20.
- 48. Goldstein JL and Brown MS. *Regulation of the mevalonate pathway*. Nature. 1990;343(6257):425-30.

- 49. Istvan ES and Deisenhofer J. *Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase*. Science. 2001;292(5519):1160-4.
- 50. Zhou D and White RH. *Early steps of isoprenoid biosynthesis in Escherichia coli*. Biochem J. 1991;273 (Pt 3):627-34.
- 51. Lange BM et al. A family of transketolases that directs isoprenoid biosynthesis via a mevalonate-independent pathway. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998;95(5):2100-4.
- 52. Sprenger GA et al. Identification of a thiamin-dependent synthase in Escherichia coli required for the formation of the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate precursor to isoprenoids, thiamin, and pyridoxol. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997;94(24):12857-62.
- 53. Hill RE et al. *The biogenetic anatomy of vitamin B6. A 13C NMR investigation of the biosynthesis of pyridoxol in Escherichia coli.* J Biol Chem. 1996;271(48):30426-35.
- 54. Cane DE, Du, S., Robinson, J. K., Hsiung, Y., Spenser, I. D. *Biosynthesis of vitamin B*₆: *Enzymatic coversion of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate to pyridoxol phosphate*. Journal of the Americal Chemical Society. 1999;121(33):7722-3.
- 55. White RH. *Stable isotope studies on the biosynthesis of the thiazole moiety of thiamin in Escherichia coli*. Biochemistry. 1978;17(18):3833-40.
- 56. Takahashi S et al. A 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase catalyzing the formation of 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate in an alternative nonmevalonate pathway for terpenoid biosynthesis. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998;95(17):9879-84.
- 57. Kuzuyama T, Shimizu, T., Takahashi, S., Seto, H. . *Fosmidomycin, a specific inhibitor* of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase in the nonmevalonate pathway for perpendid biosynthesis. Tetrahedron Letters. 1998;39(43):7913-6.
- 58. Richard SB et al. Structure of 4-diphosphocytidyl-2-C- methylerythritol synthetase involved in mevalonate- independent isoprenoid biosynthesis. Nat Struct Biol. 2001;8(7):641-8.
- 59. Rohdich F et al. *Biosynthesis of terpenoids: 4-diphosphocytidyl-2C-methyl-Derythritol synthase of Arabidopsis thaliana.* Proc Natl Acad Sci U S A. 2000;97(12):6451-6.
- 60. Rohdich F et al. *The non-mevalonate pathway of isoprenoids: genes, enzymes and intermediates.* Curr Opin Chem Biol. 2001;5(5):535-40.

- 62. Hecht S et al. *Studies on the nonmevalonate pathway to terpenes: the role of the GcpE* (*IspG*) *protein.* Proc Natl Acad Sci U S A. 2001;98(26):14837-42.
- 63. Adam P et al. *Biosynthesis of terpenes: studies on 1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl 4-diphosphate reductase.* Proc Natl Acad Sci U S A. 2002;99(19):12108-13.
- 64. Cunningham FX, Jr., Lafond TP, and Gantt E. *Evidence of a role for LytB in the nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis*. J Bacteriol. 2000;182(20):5841-8.
- 65. Lichtenthaler HK et al. *Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplasts proceeds via a mevalonate-independent pathway.* FEBS Lett. 1997;400(3):271-4.
- 66. Disch A et al. Distribution of the mevalonate and glyceraldehyde phosphate/pyruvate pathways for isoprenoid biosynthesis in unicellular algae and the cyanobacterium Synechocystis PCC 6714. Biochem J. 1998;333 (Pt 2):381-8.
- 67. Putra SR et al. Distribution of mevalonate and glyceraldehyde 3-phosphate/pyruvate routes for isoprenoid biosynthesis in some gram-negative bacteria and mycobacteria. FEMS Microbiol Lett. 1998;164(1):169-75.
- 68. Kuzuyama T. Mevalonate and nonmevalonate pathways for the biosynthesis of *isoprene units*. Biosci Biotechnol Biochem. 2002;66(8):1619-27.
- 69. Ralph SA et al. *Evolutionary pressures on apicoplast transit peptides*. Mol Biol Evol. 2004;21(12):2183-94.
- 70. Keller Y et al. *Metabolic compartmentation of plastid prenyllipid biosynthesisevidence for the involvement of a multifunctional geranylgeranyl reductase.* Eur J Biochem. 1998;251(1-2):413-7.
- 71. Collakova E and DellaPenna D. Isolation and functional analysis of homogentisate phytyltransferase from Synechocystis sp. PCC 6803 and Arabidopsis. Plant Physiol. 2001;127(3):1113-24.
- 72. Lohmann A et al. Deficiency in phylloquinone (vitamin K1) methylation affects prenyl quinone distribution, photosystem I abundance, and anthocyanin accumulation in the Arabidopsis AtmenG mutant. J Biol Chem. 2006;281(52):40461-72.

78

- 73. Ischebeck T et al. A salvage pathway for phytol metabolism in Arabidopsis. J Biol Chem. 2006;281(5):2470-7.
- 74. Gaude N et al. Nitrogen deficiency in Arabidopsis affects galactolipid composition and gene expression and results in accumulation of fatty acid phytyl esters. Plant J. 2007;49(4):729-39.
- 75. Gutkowska M et al. *Proteins are polyisoprenylated in Arabidopsis thaliana*. Biochemical and biophysical research communications. 2004;322(3):998-1004.
- 76. Swiezewska E et al. *Occurrence of prenylated proteins in plant cells*. Biochemical and biophysical research communications. 1993;192(1):161-6.
- 77. Parmryd I, Andersson B, and Dallner G. *Protein prenylation in spinach chloroplasts*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999;96(18):10074-9.
- 78. Lenaz G et al. *The role of Coenzyme Q in mitochondrial electron transport*. Mitochondrion. 2007;7 Suppl:S8-33.
- 79. Biggins J. The role of plastoquinone in the in vivo photosynthetic cyclic electron transport pathway in algae. FEBS Lett. 1974;38(3):311-4.
- 80. Chitnis PR. *Photosystem I.* Plant Physiol. 1996;111(3):661-9.
- 81. Pandya KP and King HK. Ubiquinone and menaquinone in bacteria: a comparative study of some bacterial respiratory systems. Arch Biochem Biophys. 1966;114(1):154-7.
- 82. Jemiola-Rzeminska M, Mysliwa-Kurdziel B, and Strzalka K. *The influence of structure and redox state of prenylquinones on thermotropic phase behaviour of phospholipids in model membranes.* Chem Phys Lipids. 2002;114(2):169-80.
- 83. Liebler DC. *The role of metabolism in the antioxidant function of vitamin E.* Crit Rev Toxicol. 1993;23(2):147-69.
- 84. Schneider C. *Chemistry and biology of vitamin E.* Mol Nutr Food Res. 2005;49(1):7-30.
- 85. Constantinescu A, Han D, and Packer L. *Vitamin E recycling in human erythrocyte membranes*. J Biol Chem. 1993;268(15):10906-13.

- 86. Kagan VE et al. *Recycling of vitamin E in human low density lipoproteins*. J Lipid Res. 1992;33(3):385-97.
- 87. Bohm F et al. Enhanced protection of human cells against ultraviolet light by antioxidant combinations involving dietary carotenoids. J Photochem Photobiol B. 1998;44(3):211-5.
- 88. Palozza P and Krinsky NI. *beta-Carotene and alpha-tocopherol are synergistic antioxidants*. Arch Biochem Biophys. 1992;297(1):184-7.
- 89. Ho CT and Chan AC. *Regeneration of vitamin E in rat polymorphonuclear leucocytes*. FEBS Lett. 1992;306(2-3):269-72.
- 90. Ingold KU et al. Autoxidation of lipids and antioxidation by alpha-tocopherol and ubiquinol in homogeneous solution and in aqueous dispersions of lipids: unrecognized consequences of lipid particle size as exemplified by oxidation of human low density lipoprotein. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993;90(1):45-9.
- 91. Stoyanovsky DA et al. *Ubiquinone-dependent recycling of vitamin E radicals by superoxide*. Arch Biochem Biophys. 1995;323(2):343-51.
- 92. Livrea MA and Tesoriere L. Interactions between vitamin A and vitamin E in liposomes and in biological contexts. Methods Enzymol. 1999;299:421-30.
- 93. Sigfridsson K, Hansson O, and Brzezinski P. Electrogenic light reactions in photosystem I: resolution of electron-transfer rates between the iron-sulfur centers. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995;92(8):3458-62.
- 94. Oostende C, Widhalm JR, and Basset GJ. *Detection and quantification of vitamin K(1) quinol in leaf tissues*. Phytochemistry. 2008;69(13):2457-62.
- 95. Gross J et al. A plant locus essential for phylloquinone (vitamin K1) biosynthesis originated from a fusion of four eubacterial genes. J Biol Chem. 2006;281(25):17189-96.
- 96. Ulrich MM et al. Vitamin K-dependent carboxylation. A synthetic peptide based upon the gamma-carboxylation recognition site sequence of the prothrombin propeptide is an active substrate for the carboxylase in vitro. J Biol Chem. 1988;263(20):9697-702.
- 97. Vermeer C et al. *Beyond deficiency: potential benefits of increased intakes of vitamin K for bone and vascular health.* European journal of nutrition. 2004;43(6):325-35.

- 99. Chu PH et al. Purified vitamin K epoxide reductase alone is sufficient for conversion of vitamin K epoxide to vitamin K and vitamin K to vitamin KH2. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103(51):19308-13.
- 100. Matschiner JT et al. Isolation and characterization of a new metabolite of phylloquinone in the rat. Biochim Biophys Acta. 1970;201(2):309-15.
- 101. Willingham AK and Matschiner JT. *Changes in phylloquinone epoxidase activity related to prothrombin synthesis and microsomal clotting activity in the rat.* Biochem J. 1974;140(3):435-41.
- 102. Shearer MJ and Newman P. Recent trends in the metabolism and cell biology of vitamin K with special reference to vitamin K cycling and MK-4 biosynthesis. J Lipid Res. 2014;55(3):345-62.
- 103. Jomaa H et al. Inhibitors of the nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis as antimalarial drugs. Science. 1999;285(5433):1573-6.
- 104. Wiesner J, Borrmann S, and Jomaa H. *Fosmidomycin for the treatment of malaria*. Parasitol Res. 2003;90 Suppl 2:S71-6.
- 105. Missinou MA et al. Fosmidomycin for malaria. Lancet. 2002;360(9349):1941-2.
- 106. Chugh M et al. Protein complex directs hemoglobin-to-hemozoin formation in *Plasmodium falciparum*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013;110(14):5392-7.
- 107. Butzloff S et al. *Cytometric quantification of singlet oxygen in the human malaria parasite Plasmodium falciparum*. Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology. 2012;81(8):698-703.
- 108. Dockrell HM and Playfair JH. *Killing of Plasmodium yoelii by enzyme-induced products of the oxidative burst.* Infect Immun. 1984;43(2):451-6.
- 109. Meierjohann S, Walter RD, and Muller S. *Glutathione synthetase from Plasmodium falciparum*. Biochem J. 2002;363(Pt 3):833-8.

111. Becuwe P et al. *Presence of an endogenous superoxide dismutase activity in three rodent malaria species*. Parasitol Res. 1993;79(5):349-52.

110.

1996;239(3):655-61.

- 112. Krauth-Siegel RL et al. *Glutathione reductase and glutamate dehydrogenase of Plasmodium falciparum, the causative agent of tropical malaria.* Eur J Biochem. 1996;235(1-2):345-50.
- 113. O'Brien E et al. Cloning of the glucose 6-phosphate dehydrogenase gene from *Plasmodium falciparum*. Mol Biochem Parasitol. 1994;64(2):313-26.
- 114. Atamna H and Ginsburg H. *The malaria parasite supplies glutathione to its host cell-investigation of glutathione transport and metabolism in human erythrocytes infected with Plasmodium falciparum.* Eur J Biochem. 1997;250(3):670-9.
- 115. Kanzok SM et al. *The thioredoxin system of the malaria parasite Plasmodium falciparum. Glutathione reduction revisited.* J Biol Chem. 2000;275(51):40180-6.
- 116. Krnajski Z et al. *The malaria parasite Plasmodium falciparum possesses a functional thioredoxin system.* Mol Biochem Parasitol. 2001;112(2):219-28.
- 117. Krnajski Z, Walter RD, and Muller S. Isolation and functional analysis of two thioredoxin peroxidases (peroxiredoxins) from Plasmodium falciparum. Mol Biochem Parasitol. 2001;113(2):303-8.
- 118. Bendrat K, Berger BJ, and Cerami A. *Haem polymerization in malaria*. Nature. 1995;378(6553):138-9.
- 119. Loria P et al. *Inhibition of the peroxidative degradation of haem as the basis of action of chloroquine and other quinoline antimalarials.* Biochem J. 1999;339(Pt 2):363-70.
- 120. Ginsburg H et al. Inhibition of glutathione-dependent degradation of heme by chloroquine and amodiaquine as a possible basis for their antimalarial mode of action. Biochem Pharmacol. 1998;56(10):1305-13.
- 121. Campanale N et al. Identification and characterization of heme-interacting proteins in the malaria parasite, Plasmodium falciparum. J Biol Chem. 2003;278(30):27354-61.

- 123. Giribaldi G et al. Growth of Plasmodium falciparum induces stage-dependent haemichrome formation, oxidative aggregation of band 3, membrane deposition of complement and antibodies, and phagocytosis of parasitized erythrocytes. Br J Haematol. 2001;113(2):492-9.
- 124. Simoes AP et al. *Lipid peroxidation in Plasmodium falciparum-parasitized human erythrocytes*. Arch Biochem Biophys. 1992;298(2):651-7.
- 125. Soding J, Biegert A, and Lupas AN. *The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction*. Nucleic Acids Res. 2005;33(Web Server issue):W244-8.
- 126. Repetto MG et al. *Peripheral markers of oxidative stress in probable Alzheimer patients*. Eur J Clin Invest. 1999;29(7):643-9.
- 127. Manoharan S et al. *Lipid peroxidation & antioxidants status in patients with oral squamous cell carcinoma*. Indian J Med Res. 2005;122(6):529-34.
- 128. Sattler SE et al. Vitamin E is essential for seed longevity and for preventing lipid peroxidation during germination. Plant Cell. 2004;16(6):1419-32.
- 129. Maeda H et al. *Tocopherols protect Synechocystis sp. strain PCC 6803 from lipid peroxidation*. Plant Physiol. 2005;138(3):1422-35.
- 130. Wolf G. The discovery of the antioxidant function of vitamin E: the contribution of Henry A. Mattill. J Nutr. 2005;135(3):363-6.
- 131. Kruk J et al. *Scavenging of superoxide generated in photosystem I by plastoquinol and other prenyllipids in thylakoid membranes.* Biochemistry. 2003;42(28):8501-5.
- 132. Janiszowska W and Jasinska R. Intracellular localization of labelling of tocopherols with [U-14C]tyrosine in Calendula officinalis leaves. Acta Biochim Pol. 1982;29(1-2):37-44.
- 133. Jordao FM et al. *In vitro and in vivo antiplasmodial activities of risedronate and its interference with protein prenylation in Plasmodium falciparum*. Antimicrob Agents Chemother. 2011;55(5):2026-31.

- 134. Trager W and Jenson JB. *Cultivation of malarial parasites*. Nature. 1978;273(5664):621-2.
- 135. Lambros C and Vanderberg JP. Synchronization of Plasmodium falciparum erythrocytic stages in culture. J Parasitol. 1979;65(3):418-20.
- 136. Goodyer ID et al. *Purification of mature-stage Plasmodium falciparum by gelatine flotation*. Ann Trop Med Parasitol. 1994;88(2):209-11.
- 137. Karl S, Davis TM, and St Pierre TG. *Parameterization of high magnetic field gradient fractionation columns for applications with Plasmodium falciparum infected human erythrocytes*. Malar J. 2010;9:116.
- 138. Liebler DC, Burr JA, and Ham AJ. *Gas chromatography-mass spectrometry analysis* of vitamin E and its oxidation products. Methods Enzymol. 1999;299:309-18.
- 139. Desjardins RE et al. *Quantitative assessment of antimalarial activity in vitro by a semiautomated microdilution technique*. Antimicrob Agents Chemother. 1979;16(6):710-8.
- 140. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970;227(5259):680-5.
- 141. Fujita T et al. Effects of reactive oxygen species on α-tocopherol production in mitochondria and chloroplasts of Euglena gracilis. Journal of Applied Phycology. 2008;21:185-191.
- 142. Daub ME et al. *Dihydrocercosporin singlet oxygen production and subcellular localization: a possible defense against cercosporin phototoxicity in Cercospora.* Photochemistry and photobiology. 2000;71(2):135-40.
- 143. Daub ME and Hangarter RP. *Light-induced production of singlet oxygen and superoxide by the fungal toxin, cercosporin.* Plant Physiol. 1983;73(3):855-7.
- 144. Jain SK, Wise R, and Bocchini JJ, Jr. Vitamin E and vitamin E-quinone levels in red blood cells and plasma of newborn infants and their mothers. J Am Coll Nutr. 1996;15(1):44-8.
- 145. Lipton JW et al. Prenatal cocaine administration increases glutathione and alphatocopherol oxidation in fetal rat brain. Brain Res Dev Brain Res. 2003;147(1-2):77-84.

84

- 146. Murphy ME et al. Antioxidant depletion in aortic crossclamping ischemia: increase of the plasma alpha-tocopheryl quinone/alpha-tocopherol ratio. Free Radic Biol Med. 1992;13(2):95-100.
- 147. Tohgi H et al. Concentrations of alpha-tocopherol and its quinone derivative in cerebrospinal fluid from patients with vascular dementia of the Binswanger type and Alzheimer type dementia. Neurosci Lett. 1994;174(1):73-6.
- 148. D'Alexandri FL et al. *Electrospray ionization mass spectrometry analysis of polyisoprenoid alcohols via Li+ cationization*. Anal Biochem. 2006;355(2):189-200.
- 149. Lamon-Fava S et al. *Plasma lipoproteins as carriers of phylloquinone (vitamin K1) in humans.* The American journal of clinical nutrition. 1998;67(6):1226-31.
- 150. Johnson TW et al. Recruitment of a foreign quinone into the A(1) site of photosystem I. I. Genetic and physiological characterization of phylloquinone biosynthetic pathway mutants in Synechocystis sp. pcc 6803. J Biol Chem. 2000;275(12):8523-30.
- 151. Suvarna K et al. Menaquinone (vitamin K2) biosynthesis: localization and characterization of the menA gene from Escherichia coli. Journal of bacteriology. 1998;180(10):2782-7.
- 152. Okano T et al. Conversion of phylloquinone (Vitamin K1) into menaquinone-4 (Vitamin K2) in mice: two possible routes for menaquinone-4 accumulation in cerebra of mice. J Biol Chem. 2008;283(17):11270-9.
- 153. Hempel C et al. CNS hypoxia is more pronounced in murine cerebral than noncerebral malaria and is reversed by erythropoietin. The American journal of pathology. 2011;179(4):1939-50.
- 154. Medana IM et al. Axonal injury in cerebral malaria. The American journal of pathology. 2002;160(2):655-66.
- 155. Cox D and McConkey S. *The role of platelets in the pathogenesis of cerebral malaria*. Cell Mol Life Sci. 2010;67(4):557-68.
- 156. Hempel C et al. *Erythropoietin treatment alleviates ultrastructural myelin changes induced by murine cerebral malaria.* Malar J. 2012;11:216.
- 157. Tsuchiya T et al. Cloning of chlorophyllase, the key enzyme in chlorophyll degradation: finding of a lipase motif and the induction by methyl jasmonate.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1999;96(26):15362-7.

- 158. Ishizaki K et al. *The critical role of Arabidopsis electron-transfer flavoprotein:ubiquinone oxidoreductase during dark-induced starvation.* The Plant cell. 2005;17(9):2587-600.
- 159. Furuya T et al. *Production of tocopherols by cell culture of safflower*. Phytochemistry. 1987;26(10):2741-7.
- 160. Valentin HE et al. *The Arabidopsis vitamin E pathway gene5-1 mutant reveals a critical role for phytol kinase in seed tocopherol biosynthesis.* Plant Cell. 2006;18(1):212-24.
- 161. Vetter W, Schroder M, and Lehnert K. *Differentiation of refined and virgin edible oils* by means of the trans- and cis-phytol isomer distribution. Journal of agricultural and food chemistry. 2012;60(24):6103-7.
- 162. Sattler SE et al. Characterization of tocopherol cyclases from higher plants and cyanobacteria. Evolutionary implications for tocopherol synthesis and function. Plant Physiol. 2003;132(4):2184-95.
- 163. Eisengart A et al. *The metabolism of vitamin E. II. Purification and characterization of urinary metabolites of alpha-tocopherol.* J Biol Chem. 1956;221(2):807-17.
- 164. Gross CS, Milhorat AT, and Simon EJ. *The metabolism of vitamin E. I. The absorption and excretion of d-alpha-tocopheryl-5-methyl-C14-succinate.* J Biol Chem. 1956;221(2):797-805.
- 165. Dutton PJ et al. Simon metabolites of alpha-tocopherol are not formed via a ratecontrolling scission of the 3'C-H bond. Free Radic Biol Med. 1990;9(5):435-9.
- 166. Schultz M et al. Novel urinary metabolite of alpha-tocopherol, 2,5,7,8-tetramethyl-2(2'-carboxyethyl)-6-hydroxychroman, as an indicator of an adequate vitamin E supply? Am J Clin Nutr. 1995;62(6 Suppl):1527S-34S.
- 167. Mustacich DJ et al. *Alpha-tocopherol beta-oxidation localized to rat liver mitochondria*. Free Radic Biol Med. 2010;48(1):73-81.
- 168. Martius C. *The metabolic relationships between the different K vitamins and the synthesis of the ubiquinones.* The American journal of clinical nutrition. 1961;9(4)Pt 2:97-103.

169. Billeter M, Bolliger W, and Martius C. [Studies on the Transformation of the K Vitamins Given Orally by Exchange of Side Chains and the Role of Intestinal Bacteria Therein]. Biochemische Zeitschrift. 1964;340:290-303.

ANEXOS

I - In vivo antimalarial activity and mechanisms of action of 4-nerolidylcatechol derivatives



In Vivo Antimalarial Activity and Mechanisms of Action of 4-Nerolidylcatechol Derivatives

Luiz Francisco Rocha e Silva,^{a,b,c} Karla Lagos Nogueira,^{a,b} Ana Cristina da Silva Pinto,^a Alejandro Miguel Katzin,^d Rodrigo A. C. Sussmann,^d Magno Perêa Muniz,^a Valter Ferreira de Andrade Neto,^e Francisco Célio Maia Chaves,^f Julia Penna Coutinho,^{g,h} Emerson Silva Lima,ⁱ Antoniana Ursine Krettli,^{g,h} Wanderli Pedro Tadei,^a © Adrian Martin Pohlit^a

National Institute for Amazon Research, Manaus, Amazonas, Brazil^a; Federal University of Amazonas, Manaus, Amazonas, Brazil^b; Center North University, Manaus, Amazonas, Brazil^c; Department of Parasitology, Institute of Biomedical Science, University of São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brazil^d; Laboratory of Malaria and Toxoplasmosis Biology—Rio Grande do Norte Federal University, Natal, Rio Grande do Norte, Brazil^e; EMBRAPA Amazônia Ocidental, Manaus, Amazonas, Brazil^f; René Rachou Research Center—Fiocruz, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil⁹; Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil⁹; School of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Amazonas, Manaus, Amazonas, Brazil¹

4-Nerolidylcatechol (1) is an abundant antiplasmodial metabolite that is isolated from *Piper peltatum* roots. O-Acylation or Oalkylation of compound 1 provides derivatives exhibiting improved stability and significant *in vitro* antiplasmodial activity. The aim of this work was to study the *in vitro* inhibition of hemozoin formation, inhibition of isoprenoid biosynthesis in *Plasmodium falciparum* cultures, and *in vivo* antimalarial activity of several 4-nerolidylcatechol derivatives. 1,2-O,O-Diacetyl-4-nerolidylcatechol (2) inhibited *in vitro* hemozoin formation by up to 50%. In metabolic labeling studies using [1-(*n*)-³H]geranylgeranyl pyrophosphate, diester 2 significantly inhibited the biosynthesis of isoprenoid metabolites ubiquinone 8, menaquinone 4, and dolichol 12 in cultures of *P. falciparum* 3D7. Similarly, 2-O-benzyl-4-nerolidylcatechol (3) significantly inhibited the biosynthesis of dolichol 12. *P. falciparum* in vitro protein synthesis was not affected by compounds 2 or 3. At oral doses of 50 mg per kg of body weight per day, compound 2 suppressed *Plasmodium berghei* NK65 in infected BALB/c mice by 44%. This *in vivo* result for derivative 2 represents marked improvement over that obtained previously for natural product 1. Compound 2 was not detected in mouse blood 1 h after oral ingestion or in mixtures with mouse blood/blood plasma *in vitro*. However, it was detected after *in vitro* contact with human blood or blood plasma. Derivatives of 4-nerolidylcatechol exhibit parasite-specific modes of action, such as inhibition of isoprenoid biosynthesis and inhibition of hemozoin formation, and they therefore merit further investigation for their antimalarial potential.

Despite large investments of resources and scientific advances in molecular, cellular, and clinical research on malaria, clinically effective vaccines are still far from being available as tools for the control and eradication of malaria. Early diagnosis, case management, and especially drug-based therapy are important tools for the control of this disease (1). In 2013, an estimated 198 million cases of malaria were reported, and 584,000 deaths were attributed to this disease worldwide. Today, morbidity and mortality due to malaria remain at unacceptable levels, and great challenges must be surmounted in order to attain global targets set for malaria control (2).

The control of malaria has become gradually more complex due to the spread of *Plasmodium* spp. that are resistant to the antimalarials presently used in therapy (3). In recent years, *Plasmodium falciparum* resistance to artemisinin and its derivatives has been detected in four southeast Asian countries (2). *Plasmodium vivax* is the most important malaria parasite outside the African continent, and *in vivo* resistance and *in vitro* resistance of this parasite to chloroquine have been the subject of a growing number of recent reports (4, 5). Thus, new chemical entities that may overcome the mechanisms of resistance and offer significant advances over existing drug regimens are in urgent demand.

The sequencing of the *P. falciparum* and *P. vivax* genomes has led to the identification of a growing list of potential drug targets (6). A number of molecular targets are associated with the distinct functions of different organelles present in the asexual blood phases of *Plasmodium* spp. The parasite digestive vacuole and the apicoplast are among the important organelles, due to the intensities and specificities of their metabolic activities, which are absent in human beings, thus making the metabolic processes in these organelles interesting targets for antimalarial drugs (3).

The digestive vacuole is the organelle wherein the intense degradation of erythrocyte hemoglobin occurs, thus providing *Plasmodium* spp. with amino acids for protein synthesis. A by-product of hemoglobin digestion is heme, which is toxic to the parasite. Heme polymerizes rapidly forming hemozoin (malaria pigment) in the interior of the digestive vacuole (7). The inhibition of hemozoin formation is considered to be one of the main mechanisms of action of several antimalarial drugs in clinical use, such as chloroquine and artemisinin (8, 9).

The apicoplast is an organelle similar to the plastid and is pres-

Accepted manuscript posted online 23 March 2015

Citation Rocha e Silva LF, Nogueira KL, Pinto ACDS, Katzin AM, Sussmann RAC, Muniz MP, VFDA Neto, Chaves FCM, Coutinho JP, Lima ES, Krettli AU, Tadei WP, Pohlit AM. 2015. *In vivo* antimalarial activity and mechanisms of action of 4nerolidylcatechol derivatives. Antimicrob Agents Chemother 59:3271–3280. doi:10.1128/AAC.05012-14.

Address correspondence to Adrian Martin Pohlit, ampohlit@inpa.gov.br.

Supplemental material for this article may be found at http://dx.doi.org/10.1128 /AAC.05012-14.

Copyright © 2015, American Society for Microbiology. All Rights Reserved. doi:10.1128/AAC.05012-14

Received 13 December 2014 Returned for modification 7 January 2015 Accepted 15 March 2015



FIG 1 Structures of 4-nerolidylcatechol (1) and semisynthetic derivatives 2 to 4.

ent in species of the phylum Apicomplexa, such as Plasmodium spp. In the apicoplast, unique metabolic pathways are present (biosynthesis of fatty acids, isoprenoids, iron-sulfur clusters, and heme) (10). One of the main metabolic activities of the apicoplast is the synthesis of isoprenoid compounds. In mammals, C₅ isoprene (hemi-terpene) precursors to isoprenoids are synthesized by the mevalonate pathway (MVA). Plasmodium spp. use the non-MVA (NMVA), or methylerythritol phosphate (MEP), pathway to synthesize these five-carbon isoprenoid precursors (11). Numerous intermediates and enzymes of this pathway have been characterized, and light has been shed on the physiological importance of the isoprenoid pathway and role of biosynthesized isoprenoid metabolites in Plasmodium survival (12-15). The NMVA (MEP) pathway is absent in humans and essential to *Plasmodium* survival. It is thus a potential source of targets for the development of novel antimalarials (16).

The apicoplast and digestive vacuole are distinct cellular compartments (organelles). Their physiological processes are targeted by different drugs. However, fosmidomycin exhibits dual mechanistic actions against *P. falciparum*. This compound inhibits the biosynthesis of isoprenoids in *Plasmodium* spp. and interferes in the prenylation of proteins of the digestive vacuole, thus affecting the overall process of hemozoin formation in the parasite (17).

Plant terpenes exhibiting *in vitro* antiplasmodial activity have been evaluated in *P. falciparum* to establish whether they may exert effects on the isoprenoid biosynthetic pathway. Thus, nerolidol causes total inhibition of *P. falciparum* trophozoite development at the schizont stage, and *in vitro* 50% inhibitory concentrations (IC₅₀s) in the range of 760 \pm 23 nM (mean \pm standard deviation) have been reported for nerolidol against *P. falciparum*. Terpenoid compounds like nerolidol, farnesol, and linalool have been shown to strongly inhibit the biosynthesis of both dolichol and the isoprene side chain of ubiquinones. Also, terpenes can inhibit the isoprenylation of proteins in the intraerythrocytic stages of *P. falciparum* in a specific manner that does not affect overall protein biosynthesis (18).

Traditionally used plants are sources of important antimalarial compounds, such as quinine and artemisinin and other secondary metabolites exhibiting potential as antimalarials (19, 20). The Amazon region, where malaria is endemic, is a rich source of antimalarial substances obtained from traditionally used antimalarial plants (21). 4-Nerolidylcatechol (1) is a major secondary metabolite of mixed terpene-phenylpropanoid biosynthetic origins found in the roots of *Piper peltatum*, a traditionally used antimalarial shrub from the Amazon region (Fig. 1). *P. peltatum* has been domesticated, and its roots (containing ca. 5% [wt/wt] compound 1) can yield an estimated 27 kg of compound 1 per hectare. Thus, this compound is potentially available for large-scale applications (22, 23). It exhibits *in vitro* activity against the chloroquine-pyrimethamine-cycloguanil-resistant K1 strain of *P. falciparum* (IC₅₀ = 0.67 μ M) (24) and low oral and subcutaneous activity

Natural product **1** is unstable under ambient conditions or in a freezer. Mono- and di-*O*-alkyl and di-*O*-acyl derivatives of this compound have been introduced and exhibit improved chemical stability. These derivatives exhibit a range of *in vitro* inhibitory activities against the K1 strain of *Plasmodium falciparum* (IC₅₀ = 0.67 to 23 μ M) (26, 27), antioxidant activity comparable to food preservatives BHA (butylated hydroxyanisole) and BHT (butylated hydroxytoluene), and low toxicity to normal cells (28).

Derivatives of compound 1 exhibit catechol structures that can adopt planar conformations that *a priori* could make these derivatives excellent binders of heme (inhibitors of hemozoin formation). Also, like nerolidol, farnesol, and linalool and other terpenes that inhibit terpenoid synthesis in *P. falciparum*, derivatives of compound 1 have a linear terpenyl (nerolidyl) side chain that *a priori* could make these compounds promising inhibitors of isoprenoid synthesis in *Plasmodium* spp.

The aim of this work was to investigate the potential *in vivo* antimalarial activity of 4-nerolidylcatechol (1) derivatives and explore two independent mechanisms of possible antiplasmodial action of these compounds. Herein, derivatives 2 to 4 (Fig. 1) were assayed for (i) inhibition of *in vitro* hemozoin formation, (ii) *in vitro* inhibition of the biosynthesis of isoprenoid metabolites in *P. falciparum* cultures, and (iii) *in vivo* antimalarial activity in *P. berghei*-infected mice. The acute oral toxicity and presence of compound 2 in mouse blood after oral ingestion were investigated along with the *in vitro* recovery of this compound from human and mouse blood and plasma.

MATERIALS AND METHODS

Chemical substances. Natural product 1 makes up 5% or more of the dry weight of the mature roots of *P. peltatum* and was obtained by extraction of the dry, ground roots with chloroform and ethanol (1:1), evaporation of the solvents, and column chromatography on the resulting extract as previously described (25). The three semisynthetic derivatives 2 to 4 studied herein were synthesized from freshly purified compound 1 in straightforward synthetic procedures that have been published previously (26, 29). Briefly, 1,2-O,O-diacetyl-4-nerolidylcatechol (2) was prepared by diacetylation of compound 1 in acetic anhydride/pyridine. 2-O-Benzyl-4nerolidylcatechol (3) was obtained by benzylation with benzyl bromide, and 1,2-O,O-dibenzoyl-4-nerolidylcatechol (4) was obtained by reaction with benzoyl chloride. After each of these reactions, column chromatography and preparative thin-layer chromatography were used for isolation and purification of the products whose structures were determined based on nuclear magnetic resonance (NMR) and high-resolution mass spectrometry (HRMS) techniques. The purities of the products were evaluated by thin-layer chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry, and they were considered to be >95% (26). The commercial drug standards chloroquine diphosphate (Sigma-Aldrich, Steinheim, Westphalia, Germany) and quinine sulfate (Sigma-Aldrich, Steinheim, Westphalia, Germany) were used as controls in the biological tests.

In vitro culture of *Plasmodium falciparum*. The *in vitro* culture experiments were performed using the 3D7 clone of the NF54 strain (chloroquine sensitive) and the K1 *P. falciparum* strain. Parasites were cultured using the Trager and Jensen method (30) with modifications (24). The parasites were cultured at 37°C under a low-oxygen atmosphere (5% ox-

ygen, 5% carbon dioxide, and the remainder nitrogen) in A+-type erythrocytes at a hematocrit of 3 to 5%. Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 culture medium (Sigma-Aldrich) supplemented with 0.5% Albumax I (Gibco) was used. Synchronized ring-phase cultures were obtained by two consecutive treatments at intervals of 48 h with a 5% (wt/ vol) solution of D-sorbitol (Sigma-Aldrich) as described by Lambros and Vanderberg (31). The development and growth of parasites were analyzed on smears of cultures stained with Panótico (Laborclin, Pinhais, Paraná, Brazil).

In vitro inhibition test. A microtest was performed using the method introduced by Rieckmann et al. (32) with modifications (24). Briefly, 20 mM stock solutions of compounds 1 to 4 were initially prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO) and then serially diluted (1:3) in culture medium (RPMI 1640) to obtain 7 final concentrations (100 to 0.14 μ M). Chloroquine and quinine drug standards (7 final concentrations, 2.0 to $3.4 \times 10^{-3} \,\mu\text{M}$) were used as controls. Each sample of diluted compound was tested in triplicate in a 96-well plate containing a suspension of ringstage (synchronized) parasitized red blood cells (pRBCs) with a hematocrit of 2% and 1% initial parasitemia. The final volume in each well was 200 µl. Wells containing pRBCs in culture medium and 2% DMSO were used as controls of parasite growth. The plates were incubated for 48 h at 37°C under the culture conditions described above. After incubation, smears of the contents of each well were prepared on microscope plates and colored with Panótico and examined using an optical microscope. The number of pRBCs present in a total of 2,000 red blood cells was counted. The parasitemia was expressed as a percentage. The half-maximal concentration (IC₅₀) responses were calculated using Origin 8.1 software (Origin Lab). All tests were performed in triplicate in a total of three independent experiments. One-way statistical analysis of variance (ANOVA) was performed, followed by Dunnett's post hoc test (Prism; Graph Pad, CA). A P value of <0.05 was considered statistically significant.

Animals and ethical approval. Adult female BALB/c mice (22 ± 3 g of body weight) were used for the acute toxicity assay and antimalarial *in vivo* tests and received water and food *ad libitum*. *In vivo* tests were performed using Guidelines for Ethical Conduct in The Care and Use of Animals of the National Institute for Amazon Research (INPA). This work was authorized by INPA's Commission of Ethics for the Use of Animals (CEUA 062/2012).

In vivo suppressive test with Plasmodium berghei. Evaluation of the in vivo antimalarial activity was performed based on the Peters 4-day suppressive test (33) with modifications (25). Briefly, 0.2 ml of infected blood suspension containing 1×10^5 P. berghei NK65 pRBCs was inoculated intraperitoneally in mice. The animals were randomly divided into groups of 5 individuals. Animals in test groups were treated orally or subcutaneously with compound 2 or 4 at doses of 600 to 10 mg kg⁻¹ day⁻¹. Positive-control group animals were treated orally or subcutaneously with 10 mg kg⁻¹ day⁻¹ of chloroquine, and negative-control group animals received 0.2 ml of vehicle (2% DMSO in water). Animals were treated for 4 days starting 24 h after inoculation with P. berghei. Parasitemia levels were assessed by examining Giemsa-stained thin blood smears from each animal via an optical microscope on days 5 and 7. Overall mortality was monitored daily in all groups during a period of 40 days following inoculation. The difference between the average parasitemia of negative-control groups (100%) and test groups was calculated as the percentage of parasite growth suppression (PGS) according to the following equation: $PGS = 100 \times [(A - B)/A]$, where A is the average parasitemia of the negative-control group and B corresponds to the parasitemia of the test group. Each sample was tested in 3 independent experiments. For comparisons of average parasitemia at different time points, analysis of variance was performed with a post hoc Mann-Whitney test for comparison of the means with Microcal Origin 8.1 software (Origin Lab, Northampton, MA).

In vivo acute toxicity assay. Acute toxicity of 1,2-O,O-diacetyl-4nerolidylcatechol (2) was determined in healthy mice based on the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) *Guidelines for the Testing of Chemicals for Acute Oral Toxicity* (34). Briefly, this involved gavage administration of compound **2** at doses of up to 2,000 mg kg⁻¹ in groups of three mice. Compound **2** was diluted in 2% DMSO–distilled water solution and administered in a single 200- μ l dose. The negative-control group received 200 μ l of 2% DMSO solution. Animals were observed individually during the first 30 min and periodically over 24 h. Special attention was paid over the first 4 h and daily thereafter for 14 days.

Inhibition of hemozoin formation assay. The hemozoin formation inhibition assay was performed as described by Ncokazi and Egan (35) with modifications (36). Briefly, solutions with different concentrations $(20 \text{ to } 0.156 \text{ mg ml}^{-1})$ of compounds 2 and 4 were transferred $(20 \text{ } \mu\text{l})$ in triplicate to a 96-well oval-bottomed plate. Next, bovine hematin (Sigma-Aldrich, Germany) solution (101 µl; 1.68 mM in 0.1 M sodium hydroxide) was added to each well followed by addition of pH 5 sodium acetate buffer (12 M; 58 µl) with constant stirring at 60°C. After incubation at 60°C for 60 min, the plate was centrifuged at 500 \times g for 8 min. The supernatant was discarded and the crystals of hemozoin were redissolved in 200 µl of 0.1 M sodium hydroxide and transferred to a 96 flat-bottomed well plate. The reaction was monitored on a spectrophotometer (Spectra Max 340 PC384; Molecular Devices) at 405 nm, and the results were expressed as the percent inhibition of hemozoin formation. The optical density of the untreated controls corresponded to 100% hemozoin formation. Chloroquine was used as a positive control. Each substance was tested in three independent experiments.

Treatment of P. falciparum with compounds 2 and 3 and metabolic labeling. To evaluate the effects of compounds 2 and 3 on the biosynthesis of isoprenoids in P. falciparum, a protocol described by Rodrigues Goulart et al. (18) was used. Synchronized cultures of young trophozoites (ring form) of P. falciparum 3D7 exhibiting parasitemia of ca. 10% were treated or not treated for 48 h with compound 2 or 3 at a final concentration of 4 μ M and metabolically labeled with 3.1 μ Ci ml⁻¹ of [1-(n)-³H]geranylgeranyl pyrophosphate triammonium salt { $[1-(n)-{}^{3}H]$ GGPP; 16.5 µCi mmol⁻¹; Amersham} during the last 18 h. The P. falciparum schizonts obtained after the incubation period were purified using a discontinuous Percoll gradient (37). The schizonts (80 µl) were freeze-dried, and then lipid extraction was performed with hexane (three times, 0.5 ml). The extracts were combined and dried under a stream of nitrogen and resuspended in 500 µl of hexane. Each extract was divided into 2 aliquots for high-performance liquid chromatography (HPLC) analyses of dolichol 12 or isoprene chains linked to coenzyme Q as described below. In all experiments, the same quantities of treated and untreated parasites were analyzed.

Reverse-phase HPLC (RP-HPLC). Aliquots of the hexane extracts of treated and untreated schizonts were monitored for radioactivity. Samples of hexane extracts were suspended in 250 μ l of methanol and analyzed by HPLC using a Phenomenex Luna C₁₈ column (250 by 4.6 mm), Gilson HPLC 322 pump, and Gilson 152 variable UV-visible detector. Purified fractions were obtained on a Gilson fraction collector FC203B, and UNIPOINT System software was used to analyze chromatograms.

For analysis of dolichol 12, the following gradient elution system was used at a flow rate of 1.5 ml min⁻¹: 9:1 methanol/water (solvent A) and 1:1:2 hexane/isopropanol/methanol (solvent B) were mixed in a linear gradient from 5 to 100% solvent B over 25 min. The column was further eluted for 5 min with 100% solvent B. The eluent was monitored at 210 nm. Fractions were each collected for 0.5 min (0.75 ml). The mobile phase was evaporated, scintillation liquid was added, and radioactivity was evaluated on a Beckman 5000β-radiation scintillation apparatus. Polyprenols were coinjected as standards in the same HPLC elution and fraction-collecting procedure (18).

For analysis of ubiquinones, the hexane extracts of treated and untreated schizonts were dried and resuspended in methanol and coinjected with Q_8 (ubiquinone with eight isoprene units) and menaquinone standards. An isocratic methanol/ethanol (1:1) elution system was used at a flow rate of 1.0 ml min⁻¹ with fractions being collected at intervals of 0.5 min. The detector was operated at 275 nm. After evaporation of the mobile phase, scintillation liquid was added to each purified chromatographic fraction, and the fractions were analyzed for radioactivity by using a Beckman 5000 β -radiation scintillation apparatus (15).

Data analysis. Comparative statistical analysis of peak areas from HPLC chromatograms of samples treated with compounds **2** and **3** versus untreated samples were performed for both dolichol 12 and ubiquinones. After evaluating the normality of the population, Student's *t* test was applied to the data, taking as the null hypothesis (H_0) the equality of the means between control and treated populations (with determination of 95% confidence limits). The average inhibition was then estimated with a significance of 95%.

Protein inhibition assay. For the protein synthesis inhibition assay, asynchronous cultures of *Plasmodium falciparum* were treated (4 μ M) or not treated for 48 h with 2 and 3 and marked with [1-¹⁴C]sodium acetate (3.1 μ Ci ml⁻¹; 56 mCi mmol⁻¹; Amersham) during the last 18 h. Then, the different intraerythrocytic stages of *P. falciparum* were purified as mentioned above. After purification, each stage (ring, trophozoite, and schizont) was lysed with twice its volume of an ice-cold solution made up of 10 mM Tris-HCl (pH 7.2), 150 mM sodium chloride, 2% (vol/vol) Triton X-100, 0.2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 5 mM iodoacetamide, 1 mM N-(*p*-tosyllysine) chloromethyl ketone, and leupeptin (1 μ g ml⁻¹). After incubation for 15 min at 4°C, the lysates were centrifuged at 10,000 × *g* for 30 min and the supernatants were stored in liquid nitrogen for further analysis by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE).

Gel electrophoresis. SDS-PAGE was performed in 12.5% gels as described elsewhere (38). The same number of substance-treated or untreated parasites as mentioned above were dissolved in sodium dodecyl sulfate sample buffer and applied to each well for analysis. All gels were treated with Amplify (Amersham), dried, and exposed to Kodak X-Omat film with intensifying screen sets at -70° C for 60 days.

UFLC conditions for pharmacokinetic evaluation. A Shimadzu ultrafast liquid chromatography (UFLC) Prominence system (Kyoto, Japan) consisting of a binary LC-20AT gradient pump, SPDM-20A diodearray detector (DAD), and SIL-20A automatic injector system was used to analyze blood, blood plasma, compound 2, and mixtures of these prepared as described below. A Shim-Pack XR-ODS column (50 by 2.0 mm [inner diameter], 2 µm; Shimadzu) was used at room temperature. The mobile phase consisted of 0.1% aqueous (Milli-Q) mass spectral-grade formic acid (Fluka Analytical) (A) and 0.1% formic acid in acetonitrile (LiChrosolv, Merck, Darmstadt, Germany) (B) starting at 70% B for 2 min, then a linear increase to 100% B over 8 min, 100% B for 2 min, and a linear decrease to 70% B over 4 min (column reequilibration). Total run time was 16 min. The flow rate was 0.4 ml min⁻¹ with a 15% split for mass spectral analysis (see below). The injector volume was 5 µl. Mass spectralgrade isopropanol (Chromasolve; Fluka Analytical) and acetonitrile (1:1) were used in the injector (C).

Mass spectrometer conditions for pharmacokinetic evaluation. A Bruker Daltonics MicroTOF-QII mass spectrometer (Bremen, Germany) with quadrupole-time of flight (TOF) analyzer exhibiting 17,500 full width at half maximum (FWHM) resolution and multichannel detector plate was used as the detector for the UFLC analysis described above to analyze blood, blood plasma, compound **2**, and mixtures of these prepared (below). An electrospray ionization (ESI) source in positive mode was operated using the following parameters: capillary voltage, 4,500 V; end plate offset, -500 V; nebulizer pressure, 2.0×10^5 Pa; dry heater temperature, 180°C; dry gas flow, 6.0 liters min⁻¹. The mass range analyzed was *m*/*z* 100 to 1,000. UFLC-MS analyses were controlled and processed, respectively, by using a Bruker Daltronics Hystar 3.2 system and Data Analysis 4.1 software.

Blood and blood plasma interactions with compound 2. The aim of this procedure was to evaluate potential metabolic reactions between diacetyl derivative **2** and human and mouse blood and blood plasma. It was

performed by adapting recovery and analytical procedures from previous pharmacokinetic studies on compound 1 and other compounds (39-41). Mouse or human blood plasma was the supernatant liquid (500 µl) obtained after centrifuging noncoagulated, sodium citrate-treated blood at $1,750 \times \text{g}$ for 10 min. A stock solution (1.0 mg ml⁻¹) of compound 2 in isopropanol was prepared. This solution (10 µl) was diluted 10-fold by addition to mouse or human blood plasma (90 µl). Next, isopropanol (1,000 µl) was added, and the resulting solution was vortexed (15 min) and then centrifuged (10 min, 1,750 \times g). The supernatant liquid was transferred to a clean microcentrifuge tube and then was completely dried under a stream of nitrogen. The residue was dissolved in isopropanol (500 µl), filtered (0.22-µm porosity), and analyzed by UFLC-MS. This procedure was performed with human type A+ blood plasma and blood plasma from a healthy mouse. As a control for each experiment (blank), a sample of plasma was treated with vehicle (without compound 2) and was otherwise processed as above.

The procedure described above was also performed by adding compound **2** to whole (complete) mouse or human blood. A solution of compound **2** in isopropanol (40 μ l, 1.0 mg ml⁻¹) was mixed with whole blood (360 μ l), and after gentle manual homogenizing in a clean microcentrifuge tube (10 min), the mixture was centrifuged (10 min, 1,750 × g). The supernatant liquid (100 μ l) was transferred to a new clean microcentrifuge tube. Isopropanol (1,000 μ l) was added, and the resulting solution was vortexed (10 min) and then centrifuged (10 min, 1,750 × g). The supernatant liquid was transferred to a new clean microcentrifuge tube and completely dried under a stream of nitrogen. The residue was dissolved in isopropanol (500 μ l), filtered (0.22- μ m porosity), and analyzed by UFLC-MS (39). As a control (blank) for each experiment, a sample of complete blood was treated with vehicle (without compound **2**) and was otherwise processed as above. Three independent experiments were performed.

UFLC-HRMS analysis of mouse blood after oral administration of compound 2. To study alterations in the composition of mouse blood after oral ingestion of compound 2, 50 and 600 mg kg⁻¹ of compound 2 diluted in 2% DMSO–distilled water solution were administered to healthy mice (200 µl) by gavage. One hour after administration, mice were anesthetized with 200 µl of xylazine-ketamine (1 ml kg⁻¹), and blood (500 µl) was removed from mice by cardiac puncture and stabilized with sodium citrate (anticoagulant). The citrated blood was centrifuged (10 min, 1,750 × g). The plasma (100 µl) was transferred to a clean microcentrifuge tube and isopropanol (1.0 ml) was added. The mixture was vortexed (10 min) and then centrifuged (10 min, 1,750 × g). The supernatant liquid was transferred to another microcentrifuge tube and was completely dried under a stream of nitrogen. The residue was dissolved in isopropanol (500 µl), filtered (0.22-µm porosity), and analyzed by UFLC-HRMS. Two independent experiments were performed.

RESULTS

In vitro antiplasmodial activity. $IC_{50}s$ and standard deviations for 4-nerolidylcatechol (1) and derivatives 2 to 4 against *P. falciparum* K1 and 3D7 strains are summarized in Table 1. This is the first report on the *in vitro* antiplasmodial activity ($IC_{50} = 4.8$ and $5.5 \,\mu$ M against the K1 and 3D7 strains, respectively) of compound 2. Compounds 1, 3, and 4 were evaluated against the 3D7 strain here for the first time. In general, derivatives 2 to 4 were less active *in vitro* than natural compound 1. The cytotoxicity/antiplasmodial selectivity indices of compounds 1, 3, and 4 were calculated based on previously published cytotoxicity data against normal cells (28). The concentration (4.0 μ M) of compounds 2 and 3 used to evaluate the effects on the *in vitro* incorporation of isoprene precursors into dolichols, ubiquinones, or proteins was established based on these *in vitro* inhibition results.

In vivo antimalarial activities. Compounds 2 and 4 were evaluated for *in vivo* antimalarial activity using the Peter's suppression

TABLE 1 In vitro IC ₅₀ values of 4-nerolidylcatechol (1) and
semisynthetic derivatives 2 to 4 against Plasmodium falciparum K1 and
3D7 strains and selectivity indices

	$IC_{50}^{a}(\mu M)$			
	P. falciparum ^a		Mouse	
Compound	K1	3D7	fibroblasts ^b	SI^c
1	0.67 ± 0.1	0.59 ± 0.2	31.5	47/53
2	4.85 ± 1.2	5.57 ± 1.0	<15.7	<3.2/2.8
3	7.05 ± 2.0	5.94 ± 1.8	>124	>17/>21
4	28.73 ± 10.3	38.07 ± 15.6	95.8	3.3/2.5
Chloroquine diphosphate	0.13 ± 0.1	0.05 ± 0.02	ND^d	ND
Quinine sulfate	0.16 ± 0.1	0.11 ± 0.1	ND	ND

^{*a*} IC_{50} values were calculated by probit analysis as described in Materials and Methods. Student's *t* test was applied to results. Values are expressed as means \pm standard

deviations (n = 3 experiments).

^b Mouse embryonic fibroblasts were of the 3T3L1 line. Data in this column for

compounds 1, 3, and 4 were previously published (28).

 c SI, selectivity index, calculated with the formula $\rm IC_{50}$ (fibroblasts)/IC $_{50}$ (P. falciparum) and is reported for the K1 and 3D7 strains.

^d ND, not determined.

test. The results are presented in Table 2. At 50 mg kg⁻¹ day⁻¹, a dose often used to identify potential new drugs in murine malaria (42, 43), compound 2 was considered partially active (44, 45), as it suppressed *P. berghei* growth by >30% on days 5 and 7 for both routes of administration. At the highest dose (600 mg kg⁻¹ day⁻¹), subcutaneous and oral administration of compound 2 led to 72 and 64% suppression of parasitemia, respectively, on the fifth day after treatment began. Compound 2 was inactive at doses of 10 mg kg⁻¹ day⁻¹. In general, compound 4 exhibited lower suppression of parasitemia than compound 2. Thus, maximal inhibition by compound 4 was 48% on the fifth day when administered subcutaneously. A decrease in activity on the seventh day

was in general observed compared to the corresponding activity on the fifth day at all doses tested and for both routes of administration. Survival times of infected animals were not significantly increased compared to untreated controls in any of the groups that were treated with compound **2** or **4**, although animals treated orally with 600 mg kg⁻¹ day⁻¹ of compound **2** exhibited an average survival time of 22 ± 2 days. Control groups treated with 10 mg kg⁻¹ day⁻¹ of chloroquine diphosphate exhibited 99 to 100% suppression of parasitemia on both days of observation and survival rates of >40 days. The median lethal dose (LD₅₀) of compound **2** was >2 g kg⁻¹, since no animal death or sign of intoxication was observed at any of the assayed doses.

Compound 2 was not detected by LC-MS in the plasma of healthy mice 1 h after administration of 50 or 600 mg kg⁻¹ by gavage. This compound was also not detected by UFLC-HRMS after *in vitro* dilution (0.1 mg ml⁻¹; 0.25 mM) in whole blood or blood plasma of mice. Also, no metabolites of compound 2 were discernible by UFLC-HRMS in human or mouse blood plasma, human or mouse complete blood, or in the blood of mice 1 h after oral ingestion of compound 2. Compound 2 was detected by UFLC-HRMS after *in vitro* dilution in human blood and human blood plasma as a chromatographic peak having a retention time of 6.3 min and characteristic $[M + H - C_2H_2O]^+$, $[M + M]^+$, $[M + NH_4]^+$, $[M + Na]^+$, and $[M + K]^+$ adduct/fragment ions (data not presented).

Inhibition of hemozoin formation. Figure 2 presents inhibition data for compounds **2** and **3** and chloroquine. Compound **2** inhibited hemozoin formation by 50% at a concentration of 20 mg ml⁻¹ (50 mM), and inhibitory activity decreased as a function of concentration. Compound **3** exhibited low inhibition of hemozoin formation (maximum of 20% inhibition at the highest concentration tested). At concentrations of 40 mg ml⁻¹ (ca. 100 mM), these compounds were insoluble and could not be tested.

TABLE 2 In vivo suppression of Plasmodium	<i>berghei</i> parasitemia in mice after oral	l and subcutaneous treatment with compound 2 or 4 ^a
---	---	--

	% parasitemia ± S	Avg survival time ± SD (days)				
Compound and dose	Oral	Oral		Subcutaneous		
(mg/kg/day)	Day 5	Day 7	Day 5	Day 7	Oral	Subcutaneous
Compound 2						
600	$0.9 \pm 0.3 (64)$	$1.2 \pm 0.73 (56)$	0.7 ± 0.4 (72)	$0.9 \pm 0.3 (70)$	22 ± 2	22 ± 3
200	1.0 ± 0.5 (62)	$1.43 \pm 0.7 (48)$	$1.0 \pm 0.3 (60)$	$1.0 \pm 0.2 \ (66)$	21 ± 3	19 ± 3
50	$1.5 \pm 0.6 (44)$	$1.9 \pm 0.4 (32)$	$1.8 \pm 0.8 (33)$	$1.9 \pm 0.7 (37)$	18 ± 4	19 ± 4
10	2.1 ± 0.6 (23)	2.4 ± 0.7 (12)	$2.7 \pm 0.4 (0)$	$3.8 \pm 0.7 (0)$	20 ± 3	17 ± 2
Compound 4						
200	$1.5 \pm 0.6 (46)$	$2.4 \pm 0.6 (28)$	$1.4 \pm 0.7 (48)$	$2.7 \pm 0.8 (17)$	21 ± 3	20 ± 2
50	$2.0 \pm 0.7 (27)$	$2.5 \pm 1.0 (23)$	$1.9 \pm 0.9 (32)$	$3.4 \pm 0.9 (0)$	20 ± 2	19 ± 4
10	$3.0 \pm 0.8 (0)$	$3.4 \pm 0.9 (0)$	$2.8 \pm 0.6 (0)$	3.6 ± 1.2 (0)	19 ± 1	17 ± 4
Chloroquine diphosphate						
10	0.00 (100)	0.02 (99)	0.03 (99)	0.03 (99)	>40	>40
Control	2.7 ± 0.9	3.3 ± 0.7	2.6 ± 0.6	3.0 ± 0.9	19 ± 4	21 ± 3

^{*a*} The experiment was performed following the Peters protocol (33).

^b The percentage (mean \pm standard error of the mean) of parasitized red blood cells of a total of 5 mice in three independent experiments. The percent inhibition of parasite growth (parasitemia reduction) was compared to results for untreated control mice. The Mann-Whitney test was used to evaluate statistical differences between groups. A *P* value of <0.05 was considered statistically significant.



FIG 2 Inhibition of hemozoin formation by chloroquine (A), 1,2-*O*,O-diacetyl 4-nerolidylcatechol (compound 2) (B), and 2-*O*-benzyl 4-nerolidylcatechol (compound 3) (C). Significant differences compared to drug-free controls are indicated in each graph by an asterisk ($P \le 0.05$). NT, not tested (insoluble).

Effects on the biosynthesis of isoprenoids and proteins in P. falciparum. The effects of compounds 2 and 3 on the biosynthesis of isoprenoids in P. falciparum were determined by metabolic labeling with the precursor $[1-(n)-{}^{3}H]GGPP$ in treated parasites (with 4 μ M compound 2 or 3) or untreated parasites for 48 h. The schizont extracts were analyzed by RP-HPLC for the presence of dolichol containing 12 isoprene units and ubiquinones. Figure 3 presents the radioactivities of the fractions corresponding to the retention times of dolichol 12, ubiquinone 8, and menaquinone 4 of the hexane extract obtained from the cultures in the schizont stage. The radioactivities of fractions from the tests were compared with those of the corresponding fractions from untreated controls. The latter fractions were considered to have 100% (maximal) incorporation of the radiolabeled precursor $[1-(n)^{-3}H]$ GGPP. The statistical analysis applied is described in Material and Methods.

Biosynthesis of dolichol 12 was inhibited by 41 and 45% by compounds **2** and **3**, respectively, in the schizont stage. Also, compound **2** significantly inhibited the biosynthesis of ubiquinone and menaquinone by 36 and 41%, respectively. When the cultures were treated with compound **3**, no significant difference in the biosynthesis of prenylated quinones compared to untreated controls was observed. SDS-PAGE analysis of proteins from ring stages, trophozoites, and schizonts from cultures labeled with $[1-^{14}C]$ sodium acetate and treated or not treated with compound 2 or 3 revealed that there was no inhibition of protein synthesis by these compounds (see Fig. S1 in the supplemental material).

DISCUSSION

In previous work, natural compound 1 administered subcutaneously in mice at high doses (200 to 600 mg kg⁻¹ day⁻¹) suppressed *P. berghei* by 0 and 41 to 61%, respectively, on days 5 and 7 after inoculation. Also, at oral doses of 200 to 600 mg kg⁻¹ day⁻¹ compound 1 suppressed *P. berghei* on the fifth and seventh days by 15 to 63 and 49 to 60%, respectively (25). The subcutaneous and oral activities observed for derivative 2 (Table 2) represent improved *in vivo* antimalarial activities compared to those reported previously for compound 1. The suppression of parasitemia observed for compound 2 (\geq 30%) is indicative of partial antimalarial activity (42, 43). The development of derivatives of 1 exhibiting greater *in vivo* antimalarial activity would therefore be desirable. In this vein, it is important to keep in mind the possible limitations



FIG 3 The radioactive peaks corresponding to the retention times of dolichol 12 (18), ubiquinone 8, and menaquinone 4 (15) from the hexane extract of the schizont stage, untreated or treated for 48 h with 4.0 μ M 1,2-*O*,O-diacetyl 4-nerolidylcatechol (compound 2) or 2-*O*-benzyl-4-nerolidylcatechol (compound 3) after purification by RP-HPLC as described in Materials and Methods. Metabolic labeling was performed with $[1-(n)-{}^{3}H]$ geranylgeranyl pyrophosphate. A one-way ANOVA was applied, and *P* values of <0.05 were considered statistically significant. An asterisk indicates a significant difference compared to untreated controls.

of optimizing activity based on rodent malaria as a model for human malaria infections. For example, clinically viable drugs, such as quinine (against *P. berghei* ANKA, 50% effective dose $[ED_{50}] = 34 \text{ mg kg}^{-1} \text{ day}^{-1} [46]$ and slow clearance [47]) and artemisinin derivatives, exemplified by artesunate (recrudescence below 80 mg kg⁻¹ day⁻¹ via oral against *P. vinckei*) (48) are not optimal for treating rodent malaria parasites but are of unquestionable therapeutic value in humans.

The pharmacokinetic profile of natural compound 1 has been determined in Sprague-Dawley rats (49), and bioavailability was found to be 2.7% based on blood analyses 10 to 180 min after oral administration of 10 mg kg⁻¹. Plasma concentrations of compound 1 after intravenous injection (100 mg kg⁻¹) exhibited a large distribution and rapid elimination rate, as expected for highly lipophilic drugs such as compound 1. Here, the pharmaco-kinetics of compound 2 could not be determined, presumably due to metabolism and or strong interactions of compound 2 with mouse blood and mouse blood plasma components. Interestingly, the *in vitro* tests demonstrated that compound 2 could be recovered from human blood and human blood plasma.

Several classes of antimalarial drugs are known to cause an increase in the concentration of free heme (toxic to *Plasmodium* spp.) through the inhibition of hemozoin formation. Chloroquine is the classic drug known to inhibit hemozoin formation (9, 50). The inhibition of hemozoin formation observed for derivative **2** may be related to structural features of this compound and direct interactions with heme. Compound **2** may adopt highly planar conformations and undergo noncovalent van der Waals and or π -stacking interactions with heme (50). Furthermore, the catechol oxygen atoms in derivatives of compound **1** may interact strongly with iron in heme (as is believed to occur with the endoperoxide oxygen atoms of artemisinin [8]) and undergo complexation and redox reactions (28). The plausibility of these interactions needs corroboration through docking studies and spectroscopic analysis of heme/hemo-zoin-drug intermediates.

In Plasmodium spp., isoprenoids are biosynthesized via the MEP pathway in the interior of the apicoplast. P. falciparum biosynthesizes essential intermediates and final products important to its survival via the isoprenoid pathway, such as carotenoids, vitamin E, ubiquinones, menaquinones, and dolichols, as well as geranylated and farnesylated proteins (13-17). Through the incorporation of the radioactive metabolic precursor $[1-(n)-{}^{3}H]G$ -GPP in cultures that were treated or untreated with compounds 2 or 3, it was possible to determine the inhibitory effects of these substances on the biosynthesis of dolichol, menaquinone, and ubiquinone metabolites in schizonts of the 3D7 strain of P. falciparum. The inhibition of isoprenoid biosynthesis in P. falciparum by compounds 2 and 3 was considered good because it occurred at concentrations (4 μ M) lower than the IC₅₀s, while overall protein biosynthesis was unaffected. No significant inhibition of isoprenoid biosynthesis by compounds 2 or 3 was observed in ring and trophozoite stages of P. falciparum (data not presented). This result is related to the relatively low metabolic production of isoprenoids at these early stages in parasite development (12, 18).

The strong inhibition of dolichol 12 biosynthesis in schizonts (Fig. 3) can be explained by the interference of compounds 2 and 3 in the isoprene chain elongation mechanism in dolichol biosynthesis, as has been suggested for the isoprene chains attached to the benzoquinone ring (51). The reduction in the availability of dolichol 12 produced by these derivatives can presumably inter-

fere directly in posttranslational protein modifications (12, 16) and other metabolic processes that require the presence of dolichols.

Compound 2 strongly inhibited the biosynthesis of the prenylated metabolites ubiquinone and menaquinone in P. falciparum (Fig. 3). This is significant, as ubiquinones and menaquinones are linked to the survival of Plasmodium spp. in the host. Ubiquinone, also known as coenzyme Q, is an important electron carrier which is actively synthesized in the mitochondria of *Plasmodium* parasites and exerts an important protective antioxidant effect in the parasite (52, 53). An octaprenyl pyrophosphate synthase has been found in the intraerythrocytic stages of P. falciparum that is responsible for the biosynthesis of the isoprene side chains attached to the benzoquinone ring of ubiquinones. The recombinant version of this synthase exhibited marked similarity to that of the native, partially purified octaprenyl pyrophosphate synthase from schizont-stage parasites and was inhibited by nerolidol with a K, of 10 nM (51). Vitamin K_2 , also known as menaquinone (MQ), is in a class of fat-soluble vitamins that regulates metabolic pathways. In radiolabeling experiments of the direct precursor, Tonhosolo et al. (15) demonstrated that vitamin K₂ is synthesized by *P. falcipa*rum and acts as an important electron receiver of the respiratory chain. Also, inhibition of menaquinone production by Ro 48-8071, a known 1,4-dihydroxy-2-naphthoate prenyltransferase inhibitor, resulted in decreased parasite growth. Given the importance of menaquinone and ubiquinone to parasite survival, future work should focus on the specific molecular targets upon which derivative 2 directly acts during the biosynthesis of these compounds.

The inhibition of hemozoin formation and the inhibition of isoprenoid biosynthesis in Plasmodium generally involve independent molecular targets (6, 7, 16). However, work by Howe et al. (17) and others has demonstrated that the prenvlation of the small ATPase Rab5 is associated with small hemoglobin-containing vacuoles that collectively represent >50% of hemoglobin uptake in trophozoites and schizonts (54). Disruption of posttranslational prenylation of Rab5 by fosmidomycin in turn disrupts the localization of Rab5 in vacuolar membranes and is associated with abnormal food vacuole morphologies. P. falciparum is believed to perform de novo synthesis of the terpenoid fragments it requires for ubiquinone and prenylated protein synthesis (17). It is conceivable that besides interfering in the biosynthesis of terpenoids in the apicoplast, 4-nerolidylcatechol derivatives 2 and 3 may interrupt the posttranslational prenylation of Rab5 and other proteins associated with normal vacuolar membrane formation in P. falciparum. However, the action of 2 and 3 on prenyltransferases or digestive vacuole formation mechanisms in P. falciparum was not demonstrated herein. 4-Nerolidylcatechol derivatives biochemically inhibited the synthesis of isoprenoids by inhibiting the incorporation of precursors in the metabolic pathway in the live parasite. Also, these derivatives chemically inhibited hemozoin formation in vitro, especially compound 2, which exhibits inhibition similar to chloroquine, thus providing indirect evidence for this mechanism of action. Derivatives of 4-nerolidylcatechol potentially could act on different targets, in the apicoplast and in the food vacuole, in distinct mechanistic processes. Future work should investigate the possibility that derivatives of 1 are inhibitors of prenyl transferases that are important to digestive vacuole physiology and function.

4-Nerolidylcatechol (1) is a major component of infusions and

other extracts prepared from the roots and leaves (22-25, 55) of the traditionally used caapeba plant (Piper peltatum and P. umbellata) (56). Caapeba extracts are active in vitro against P. falciparum and inactive or variably active against *P. berghei* in mice (57–62). Interestingly, the deactivated blood plasma taken from healthy rodents after oral ingestion of caapeba extracts inhibits P. falciparum in vitro (59). We isolated compound 1 from P. peltatum extracts and demonstrated that it exhibits good in vitro inhibition against P. falciparum (24, 25, 29) and, after oral ingestion, activates murine blood plasma against P. falciparum (25). However, as discussed above, P. berghei exhibits low sensitivity to caapeba extracts and 4-nerolidylcatechol and, as seen here, to derivatives of 1. In similar circumstances, diamidines were tested in the P. vinckei model because P. berghei is almost insensitive to these drugs. Further studies on 4-nerolidylcatechol derivatives should explore P. vinckei-infected mouse or P. falciparum-infected humanized mouse (HuMouse) models (63).

Natural compound 1 exhibits *in vitro* antiplasmodial activity that is desirable as a starting point for a chemistry program for the development of new antimalarials; however, its *in vivo* antimalarial activity and stability are not satisfactory. In general, derivatives of compound 1 exhibit decreased *in vitro* antiplasmodial activity and improved stability and *in vivo* antimalarial activity compared to 1. Nonetheless, the levels of *in vivo* activity observed for compound 2 are not satisfactory and may be negatively influenced by poor pharmacokinetics.

Derivatives of 4-nerolidylcatechol inhibit *in vitro* biosynthesis of vital isoprenoid metabolites in *P. falciparum*. New derivatives with improved activity, solubility, and pharmacokinetics are needed. Poor pharmacokinetics associated with low water solubility (and fast clearance) were also problems identified for the low-polarity natural antimalarial artemisinin, and these properties were markedly improved by the development of the water-soluble derivative sodium artesunate (64). Also, formulations of derivatives of compound 1 may help to improve bioavailability. In this vein, an inclusion complex of compound 1 and derivatized cyclodextrin has been prepared that exhibits improved water solubility (65). The development of more soluble, structurally diverse 4-nerolidylcatechol derivatives and formulations could be important strategies for increasing bioavailability and the *in vivo* antimalarial activities of these compounds.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Valnice de Jesus Peres for technical support provided during the *in vitro* culturing and *in vitro* testing procedures for inhibition of the biosynthesis of isoprenoids.

We recognize financial support received from FAPEAM (NOSSAPLAM/ PRONEX and Universal), FAPESP, and CNPq (Universal, Brazilian National Malaria Network, Bionorth Research and Graduate Network). A.M.K., A.M.P., A.U.K., and V.F.D.A.N. are CNPq/PQ-Research Productivity Fellowship recipients, and L.F.R.S. was a PCI/INPA/CNPq bursary recipient during much of this work.

REFERENCES

- 1. WHO. 2010. Guidelines for the treatment of malaria, 2nd ed. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- 2. WHO. 2014. World malaria report 2014. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Miller LH, Ackerman HC, Su XZ, Wellems TE. 2013. Malaria biology and disease pathogenesis: insights for new treatments. Nat Med 19:156– 167. http://dx.doi.org/10.1038/nm.3073.
- Chehuan YF, Costa MR, Costa JS, Alecrim MG, Nogueira F, Silveira H, Brasil LW, Melo GC, Monteiro WM, Lacerda MV. 2013. *In vitro* chloro-

quine resistance for *Plasmodium vivax* isolates from the western Brazilian Amazon. Malar J 12:226. http://dx.doi.org/10.1186/1475-2875-12-226.

- Marques MM, Costa MR, Santana Filho FS, Vieira JL, Nascimento MT, Brasil LW, Nogueira F, Silveira H, Reyes-Lecca RC, Monteiro WM, Lacerda MV, Alecrim MG. 2014. *Plasmodium vivax* chloroquine resistance and anemia in the western Brazilian Amazon. Antimicrob Agents Chemother 58:342–347. http://dx.doi.org/10.1128/AAC.02279-12.
- 6. Bispo NA, Culleton R, Silva LA, Cravo P. 2013. A systematic *in silico* search for target similarity identifies several approved drugs with potential activity against the *Plasmodium falciparum* apicoplast. PLoS One 8:e59288. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0059288.
- Egan TJ. 2008. Haemozoin formation. Mol Biochem Parasitol 157:127– 136. http://dx.doi.org/10.1016/j.molbiopara.2007.11.005.
- Messori L, Piccioli F, Eitler B, Bergonzi MC, Bilia AR, Vincieri FF. 2003. Spectrophotometric and ESI-MS/HPLC studies reveal a common mechanism for the reaction of various artemisinin analogues with hemin. Bioorg Med Chem Lett 13:4055–4057. http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl .2003.08.032.
- 9. Thome R, Lopes SC, Costa FT, Verinaud L. 2013. Chloroquine: modes of action of an undervalued drug. Immunol Lett 153:50–57. http://dx.doi .org/10.1016/j.imlet.2013.07.004.
- Ralph SA, van Dooren GG, Waller RF, Crawford MJ, Fraunholz MJ, Foth BJ, Tonkin CJ, Roos DS, McFadden GI. 2004. Tropical infectious diseases: metabolic maps and functions of the *Plasmodium falciparum* apicoplast. Nat Rev Microbiol 2:203–216. http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro843.
- Mitamura T, Palacpac NM. 2003. Lipid metabolism in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes: possible new targets for malaria chemotherapy. Microbes Infect 5:545–552. http://dx.doi.org/10.1016/S1286 -4579(03)00070-4.
- Couto AS, Kimura EA, Peres VJ, Uhrig ML, Katzin AM. 1999. Active isoprenoid pathway in the intra-erythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*: presence of dolichols of 11 and 12 isoprene units. Biochem J 341: 629–637. http://dx.doi.org/10.1042/0264-6021:3410629.
- Sussmann RA, Angeli CD, Peres VJ, Kimura EA, Katzin AM. 2011. Intraerythrocytic stages of *Plasmodium falciparum* biosynthesize vitamin E. FEBS Lett 585:3985–3991. http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2011.11 .005.
- 14. Tonhosolo R, D'Alexandri FL, de Rosso VV, Gazarini ML, Matsumura MY, Peres VJ, Merino EF, Carlton JM, Wunderlich G, Mercadante AZ, Kimura EA, Katzin AM. 2009. Carotenoid biosynthesis in intraerythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*. J Biol Chem 284:9974–9985. http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M807464200.
- Tonhosolo R, Gabriel HB, Matsumura MY, Cabral FJ, Yamamoto MM, D'Alexandri FL, Sussmann RA, Belmonte R, Peres VJ, Crick DC, Wunderlich G, Kimura EA, Katzin AM. 2010. Intraerythrocytic stages of *Plasmodium falciparum* biosynthesize menaquinone. FEBS Lett 584:4761– 4768. http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2010.10.055.
- Jordão FM, Kimura EA, Katzin AM. 2011. Isoprenoid biosynthesis in the erythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*. Mem Inst Oswaldo Cruz 106(Suppl 1):134–141. http://dx.doi.org/10.1590/S0074-0276201000900 018.
- 17. Howe R, Kelly M, Jimah J, Hodge D, Odom AR. 2013. Isoprenoid biosynthesis inhibition disrupts Rab5 localization and food vacuolar integrity in *Plasmodium falciparum*. Eukaryot Cell 12:215–223. http://dx.doi .org/10.1128/EC.00073-12.
- Rodrigues Goulart H, Kimura EA, Peres VJ, Couto AS, Aquino Duarte FA, Katzin AM. 2004. Terpenes arrest parasite development and inhibit biosynthesis of isoprenoids in *Plasmodium falciparum*. Antimicrob Agents Chemother 48:2502–2509. http://dx.doi.org/10.1128/AAC.48.7.2502-2509.2004.
- Schmidt TJ, Khalid SA, Romanha AJ, Alves TM, Biavatti MW, Brun R, Costa FB, Castro SL, Ferreira VF, Lacerda MV, Lago JH, Leon LL, Lopes NP, Amorim RCN, Niehues M, Ogungbe IV, Pohlit AM, Scotti MT, Setzer WN, Soeiro MNC, Steindel M, Tempone AG. 2012. The potential of secondary metabolites from plants as drugs or leads against protozoan neglected diseases: part I. Curr Med Chem 19:2128–2175. http: //dx.doi.org/10.2174/092986712800229023.
- 20. Schmidt TJ, Khalid SA, Romanha AJ, Alves TM, Biavatti MW, Brun R, Costa FB, Castro SL, Ferreira VF, Lacerda MV, Lago JH, Leon LL, Lopes NP, Amorim RCN, Niehues M, Ogungbe IV, Pohlit AM, Scotti MT, Setzer WN, Soeiro MNC, Steindel M, Tempone AG. 2012. The potential of secondary metabolites from plants as drugs or leads against protozoan neglected diseases: part II. Curr Med Chem 19:2176–3228. http://dx.doi.org/10.2174/092986712800229087.

- Pohlit AM, Lima RB, Frausin G, Rocha e Silva LF, Lopes SC, Moraes CB, Cravo P, Lacerda MV, Siqueira AM, Freitas-Junior LH, Costa FT. 2013. Amazonian plant natural products: perspectives for discovery of new antimalarial drug leads. Molecules 18:9219–9140. http://dx.doi.org /10.3390/molecules18089219.
- Pinto ACS, Chaves FCM, Santos PA, Nunez CV, Tadei WP, Pohlit AM. 2010. *Piper peltatum*: biomass and 4-nerolidylcatechol production. Planta Med 76:1473–1476. http://dx.doi.org/10.1055/s-0029-1240938.
- Pinto ACS, Pena EA, Chaves FCM, Pohlit AM. 2006. Biomass production in cultivated *Pothomorphe peltata* Miq. (Piperaceae) as a function of harvest time in Manaus, Amazonas State, Brazil. Braz J Med Plants 8(Spec Ed):98–101.
- 24. de Andrade-Neto VF, Pohlit AM, Pinto ACS, Silva ECC, Nogueira KL, Melo MRS, Henrique MC, Amorim RCN, Rocha e Silva LF, Costa MR, Nunomura RC, Nunomura SM, Alecrim WD, Alecrim MG, Chaves FC, Vieira PP. 2007. *In vitro* inhibition of *Plasmodium falciparum* by substances isolated from Amazonian antimalarial plants. Mem Inst Oswaldo Cruz 102:359–365. http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762007000300016.
- Rocha e Silva LF, Pinto ACS, Pohlit AM, Quignard ELJ, Vieira PPR, Tadei WP, Chaves FCM, Samonek JF, Lima CA, Costa MR, Alecrim MG, Andrade-Neto VF. 2011. *In vivo* and *in vitro* antimalarial activity of 4-nerolidylcatechol. Phytother Res 25:1181–1188. http://dx.doi.org/10 .1002/ptr.3424.
- Pinto ACS, Rocha e Silva LF, Cavalcanti BC, Melo MR, Chaves FC, Lotufo LVC, Moraes MO, Andrade-Neto VF, Tadei WP, Pessoa CO, Vieira PPR, Pohlit AM. 2009. New antimalarial and cytotoxic 4-nerolidylcatechol derivatives. Eur J Med Chem 44:2731–2735. http://dx.doi.org /10.1016/j.ejmech.2008.10.025.
- Pinto ACS, Melo MRS, Andrade Neto VF, Chaves FCM, Vieira PPR, Pohlit AM. 9 July 2009. Derivatives of 4-nerolidylcatechol, pharmaceutical compositions comprising them and process for producing the same. WIPO patent WO/2009/082795.
- Silva Lima E, Pinto ACS, Nogueira KL, Rocha e Silva LF, Oliveira de Almeida PD, Carvalho de Vasconcellos M, Chaves FCM, Tadei WP, Pohlit AM. 2012. Stability and antioxidant activity of semi-synthetic derivatives of 4-nerolidylcatechol. Molecules 18:178–189. http://dx.doi.org /10.3390/molecules18010178.
- Pinto ACS, Pessoa CO, Lotufo LVC, Moraes MO, Moraes ME, Cavalcanti BC, Nunomura SN, Pohlit AM. 2006. *In vitro* cytotoxicity of *Pothomorphe peltata* (L.) Miquel (Piperaceae), isolated 4-nerolidylcatechol and its semi-synthetic diacetyl derivative. Braz J Med Plants 8(Spec Ed):205–211.
- Trager W, Jensen JB. 1976. Human malaria parasites in continuous culture. Science 193:673–675. http://dx.doi.org/10.1126/science.781840.
- Lambros C, Vanderberg JP. 1979. Synchronization of *Plasmodium fal*ciparum erythrocytic stages in culture. J Parasitol 65:418–420. http://dx .doi.org/10.2307/3280287.
- Rieckmann KH, Campbell GH, Sax LJ, Mrema JE. 1978. Drug sensitivity of *Plasmodium falciparum*. An *in vitro* microtechnique. Lancet i:22–23.
- Peters W. 1965. Drug resistance in *Plasmodium berghei* Vincke and Lips, 1948. I. Chloroquine resistance. Exp Parasitol 17:80–89.
- OECD. 2001. Guidelines for the testing of chemicals. Acute oral toxicity; acute toxic class method 423. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, France.
- Ncokazi KK, Egan TJ. 2005. A colorimetric high-throughput betahematin inhibition screening assay for use in the search for antimalarial compound. Anal Biochem 338:306–319. http://dx.doi.org/10.1016/j.ab .2004.11.022.
- 36. Aguiar ACC, Santos RM, Figueiredo FJB, Cortopassi WA, Pimentel AS, França TCC, Meneghetti MR, Krettli AU. 2012. Antimalarial activity and mechanisms osaction of two novel 4-aminoquinolines against chloroquine-resistant parasites. PLoS One 7:1–9. http://dx.doi.org/10.1371 /journal.pone.0037259.
- Braun-Breton C, Jendoubi M, Brunet E, Perrin L, Scaife J, Pereira da Silva L. 1986. *In vivo* time course of synthesis and processing of major schizont membrane polypeptides in *Plasmodium falciparum*. Mol Biochem Parasitol 20:33–43. http://dx.doi.org/10.1016/0166-6851(86)90140-4.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680–685. http://dx.doi.org/10 .1038/227680a0.
- 39. Lee J-H, Chae Y-J, Lee K-R, Ahn SH, Seo JW, Jin QR, Woo YA, Lee GW, Cho SC, Kwon SW, Park DH. 2012. Development of a LC-MS method for quantification of FK-3000 and its application to *in vivo* phar-

macokinetic study in drug development. J Pharm Biomed Anal **70:**587–591. http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2012.05.030.

- Rezende KR, Barros SBM. 2004. Quantification of 4-nerolidylcatechol from *Pothomorphe umbellata* (Piperaceae) in rat plasma samples by HPLC-UV. Rev Bras Cienc Farm 40:373–380. http://dx.doi.org/10.1590/S 1516-93322004000300013.
- 41. Bastos JCS, Cunha LC, Ostrosky EA. 2013. Desenvolvimento e validação de método analítico para determinação do 4-nerolidilcatecol (4-NRC) em solução de proteína plasmática para aplicação em estudos de microdiálise cutânea. Rev Ciênc Farm Básica Apl 34:191–198.
- 42. Coutinho JP, Aguiar AC, Santos PA, Lima JC, Rocha MG, Zani CL, Alves TM, Santana AE, Pereira M, Krettli AU. 2013. Aspidosperma (Apocynaceae) plant cytotoxicity and activity towards malaria parasites. Part I: Aspidosperma nitidum (Benth) used as a remedy to treat fever and malaria in the Amazon. Mem Inst Oswaldo Cruz 108:974–982. http://dx .doi.org/10.1590/0074-0276130246.
- Krettli AU, Adebayo JO, Krettli LG. 2009. Testing of natural products and synthetic molecules aiming at new antimalarials. Curr Drug Targets 10:261–270. http://dx.doi.org/10.2174/138945009787581203.
- 44. Carvalho LH, Brandão MG, Santos-Filho D, Lopes JL, Krettli AU. 1991. Antimalarial activity of crude extracts from Brazilian plants studied *in vivo* in *Plasmodium berghei*-infected mice and *in vitro* against *Plasmodium falciparum* in culture. Braz J Med Biol Res 24:1113–1123.
- 45. Mota ML, Tavares LCL, Costa JGM, Costa LS, Rocha HAO, Rocha e Silva LF, Pohlit AM, Andrade Neto VF. 2012. *In vitro* and *in vivo* antimalarial activity of essential oils and chemical components from three medicinal plants found in northeastern Brazil. Planta Med 78:658–664. http://dx.doi.org/10.1055/s-0031-1298333.
- 46. Garavito G, Bertani S, Quiliano M, Valentin A, Aldana I, Deharo E. 2012. The *in vivo* antimalarial activity of methylene blue combined with pyrimethamine, chloroquine and quinine. Mem Inst Oswaldo Cruz 107: 820–823. http://dx.doi.org/10.1590/S0074-0276201200060019.
- 47. Jiménez-Díaz MB, Viera S, Ibáñez J, Mulet T, Magán-Marchal N, Garuti H, Gómez V, Cortés-Gil L, Martínez A, Ferrer S, Fraile MT, Calderón F, Fernández E, Shultz LD, Leroy D, Wilson DM, García-Bustos JF, Gamo FJ, Angulo-Barturen I. 2013. A new *in vivo* screening paradigm to accelerate antimalarial drug discovery. PLoS One 8:e66967. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0066967.
- Lombard MC, N'Da DD, Tran Van Ba C, Wein S, Norman J, Wiesner L, Vial H. 2013. Potent *in vivo* antimalarial activity and representative snapshot pharmacokinetic evaluation of artemisinin-quinoline hybrids. Malar J 12:71. http://dx.doi.org/10.1186/1475-2875-12-71.
- Rezende KR. 2002. Oral bioavailability of 4-nerolidylcatechol as an isolate and from a crude *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. extract administered to Sprague-Dawley rats. Ph.D. thesis. University of São Paulo, São Paulo, Brazil. (In Portugese.)
- Kumar S, Guha M, Choubey V, Maity P, Bandyopadhyay U. 2007. Antimalarial drugs inhibiting hemozoin (beta-hematin) formation: a mechanistic update. Life Sci 80:813–828. http://dx.doi.org/10.1016/j.ifs .2006.11.008.
- 51. Tonhosolo R, D'Alexandri FL, Genta FA, Wunderlich G, Gozzo FC, Eberlin MN, Peres VJ, Kimura EA, Katzin AM. 2005. Identification, molecular cloning and functional characterization of an octaprenyl pyrophosphate synthase in intra-erythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*. Biochem J **392**:117–126. http://dx.doi.org/10.1042/BJ2005441.
- de Macedo CS, Uhrig ML, Kimura EA, Katzin AM. 2002. Characterization of the isoprenoid chain of coenzyme Q in *Plasmodium falciparum*. FEMS Microbiol Lett 207:13–20. http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968 .2002.tb11021.x.
- Nowicka B, Kruk J. 2010. Occurrence, biosynthesis and function of isoprenoid quinones. Biochim Biophys Acta 1797:1587–1605. http://dx.doi .org/10.1016/j.bbabio.2010.06.007.
- 54. Elliott DA, McIntosh MT, Hosgood HD, Chen S, Zhang G, Baevova P, Joiner KA. 2008. Four distinct pathways of hemoglobin uptake in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. Proc Natl Acad Sci U S A 105: 2463–2468. http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0711067105.
- Noriega P, Ropke CD, Camilo CM, Freitas PCD, Barros SBM. 2005. Evaluation by factorial analysis of the conditions for extraction of 4-nerolidylcatechol from *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. Rev Bras Ciênc Farm 41:261–269. (In Portuguese.) http://dx.doi.org/10.1590/S1516 -93322005000200015.
- 56. Milliken W. 1997. Plants for malaria, plants for fever: medicinal species in

Latin America—a bibliographic survey, p 83–86. Kew Publishing, Royal Botanic Gardens, Kew, United Kingdom.

- Amorim CZ, Gomes BE, Flores CA, Cordeiro RSB. 1986. Antimalarial activity screening from plants of the genus *Pothomorphe*. Braz J Med Biol Res 19:569A.
- Amorim CZ, Flores CA, Gomes BE, Marques AD, Cordeiro RSB. 1988. Screening for antimalarial activity in the genus *Pothomorphe*. J Ethnopharmacol 24:101–106.
- 59. Sala-Neto F, Da Silva JS, Pires RO, Nascimento NP, Brenner C, Boubli JP, Tosta CE. 1992. A new methodology for the evaluation of the antimalarial activity of plant products: application to the study of 83 species from the Brazilian flora. Rev Soc Bras Med Trop 25:92. (In Portugese.)
- Adami YL. 1995. In vivo and in vitro study on the potential antimalarial activity of Pothomorphe peltata and Pothomorphe umbellata (L.) Miq. Master's dissertation. Parasitology Graduate Program, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil. (In Portugese.)
- 61. de Ferreira-da-Cruz MF, Adami YL, Espinola-Mendes EC. 2000. The intraperitoneal *Plasmodium berghei*-Pasteur infection of Swiss mice is not a

system that is able to detect the antiplasmodial activity in the *Pothomorphe* plant extracts that are used as antimalarials in Brazilian endemic areas. Exp Parasitol 94:243–247. http://dx.doi.org/10.1006/expr.2000.4494.

- Atindehou KK, Schmid C, Brun R, Kone MW, Traore D. 2004. Antitrypanosomal and antiplasmodial activity of medicinal plants from Côte d'Ivoire. J Ethnopharmacol 90:221–227. http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2003 .09.032.
- Jimenez-Diaz MB, Viera S, Fernandez-Alvaro E, Angulo-Barturen I. 2014. Animal models of efficacy to accelerate drug discovery in malaria. Parasitology 141:93–103. http://dx.doi.org/10.1017/S0031182013000991.
- 64. Hsu E. 2006. The history of qing hao in the Chinese materia medica. Trans R Soc Trop Med Hyg 100:505–508. http://dx.doi.org/10.1016/j.trstmh .2005.09.020.
- 65. Soares LA, Leal AFVB, Fraceto LF, Maia ER, Resck IS, Kato MJ, Gil ES, Sousa AR, Cunha LC, Rezende KR. 2009. Host–guest system of 4-nerolidylcatechol in 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin: preparation, characterization and molecular modeling. J Incl Phenom Macrocycl Chem 64: 23–35. http://dx.doi.org/10.1007/s10847-009-9532-y.

II - Quantification of nerolidol in mouse plasma using gas chromatography-mass spectrometry.

Contents lists available at ScienceDirect



Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jpba



Short communication

Quantification of nerolidol in mouse plasma using gas chromatography-mass spectrometry



Alexandre Yukio Saito^{a, 1}, Rodrigo Antonio Ceschini Sussmann^a, Emilia Akemi Kimura^a, Maria Belen Cassera^{b,*}, Alejandro Miguel Katzin^{a,**}

^a Department of Parasitology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 1374, São Paulo, SP 05508-000, Brazil
^b Department of Biochemistry and Virginia Tech Center for Drug Discovery, M/C 0308, Virginia Tech, Blacksburg, VA 24061, United States

ARTICLE INFO

Article history: Received 30 January 2015 Received in revised form 20 March 2015 Accepted 26 March 2015 Available online 3 April 2015

Keywords: Nerolidol Sesquiterpene Plasma GC-MS Quantification

1. Introduction

Nerolidol (3,7,11-trimethyl-1,6,10-dodecatrien-3-ol) is a sesquiterpene alcohol found in essential oils from several plants [1]. It is frequently used in cosmetics (*e.g.*, shampoos and perfumes) and in non-cosmetic products (detergents and cleansers). Nerolidol is approved by the U.S. Food and Drug Administration as a food flavoring agent [2]. Many medicinal benefits of nerolidol have been identified including anti-tumor [3,4] and anti-bacterial properties [1]. Generally, terpenes are considered potent skin permeation enhancers with low toxicity and nerolidol has been tested as a skin permeation enhancer for transdermal delivery of therapeutic drugs [5,6]. In addition, nerolidol has demonstrated activity against several parasites including *Leishmania* [7], *Trypanosoma* [8,9], *Plasmodium* [10], *Schistosoma* [11] and *Babesia* [12]. *Leishmania amazonensis*-infected BALB/c mice treated with nerolidol significant reduction of lesion sizes was observed [7].

The analytical technique that is often used for nerolidol detection is gas chromatography–flame ionization detection (GC–FID) or gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) [13]. Although GC alone is the most commonly used method for detection of terpene olefins, the retention time or retention index alone is

http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2015.03.030 0731-7085/© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

ABSTRACT

Nerolidol is a naturally occurring sesquiterpene found in the essential oils of many types of flowers and plants. It is frequently used in cosmetics, as a food flavoring agent, and in cleaning products. In addition, nerolidol is used as a skin penetration enhancer for transdermal delivery of therapeutic drugs. However, nerolidol is hemolytic at low concentrations. A simple and fast GC–MS method was developed for preliminary quantification and assessment of biological interferences of nerolidol in mouse plasma after oral dosing. Calibration curves were linear in the concentration range of $0.010-5 \mu g/mL$ nerolidol in mouse plasma with correlation coefficients (r) greater than 0.99. Limits of detection and quantification were 0.0017 and 0.0035 $\mu g/mL$, respectively. The optimized method was successfully applied to the quantification of nerolidol in mouse plasma.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

often not sufficient for positive confirmation of a particular terpene. Sesquiterpene olefins that possess boiling points ranging from \sim 250 to 280 °C, are ideal candidates for GC–MS analysis and it is generally considered sufficient for positive identification of a terpene when the sample is run in conjunction with an authentic standard [14].

Detection of nerolidol is usually related to studies of essential oils from plants and, to our knowledge, quantification of nerolidol in mouse plasma has not been reported. We previously reported that nerolidol has demonstrated activity against *in vitro Plasmodium falciparum* with a maximum inhibitory concentration (IC_{50}) of 760 nM $(0.169 \ \mu g/mL)$ [10]. The aim of this present study was developing a simple and fast GC–MS method for preliminary quantification and assessment of biological interferences of nerolidol in mouse plasma after oral dosing to aid future malaria efficacy studies. In addition, nerolidol is hemolytic at low concentrations [15]; therefore, having a robust platform to quantify nerolidol levels in plasma after administration of a therapeutic dose is of great value. The analytical performance of the method was evaluated and successfully applied to the quantification of nerolidol in mouse plasma.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and reagents

Cis-/trans-3,7,11-trimethyl-1,6,10-dodecatrien-3-ol (*cis-/trans*-nerolidol, 1:3, w/w) was obtained from Sigma–Aldrich (St. Louis,

^{*} Corresponding author.

^{**} Corresponding author. Tel.: +55 1130917267; fax: +55 1130917417.

MO, USA). The 3,7,11-trimethyldodeca-2,6,10-trien-1-ol (farnesol) obtained from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA) was used as the internal standard (IS). Acetonitrile, methanol, and *n*-hexane (HPLC grade) were purchased from Fisher Scientific (Pittsburgh, PA, USA).

2.2. Instrumentation and GC-MS conditions

Separations and analyses were performed using a Trace GC gas chromatography system in tandem with a mass spectrometer Y2K ion trap (MS) PolarisQ System (Finnigan, ThermoQUEST Inc., San Jose, CA, USA). Data acquisition and analyses were performed using Xcalibur V1.4. A TR-5MS capillary column $(30 \text{ m} \times 0.25 \text{ mm} \times 0.25 \text{ }\mu\text{m})$, Thermo Scientific, USA) was used for this study. The temperature of the GC injector was 220 °C, equipped with a splitless liner. The GC column temperature was set to 60 °C for 1 min and programmed to ramp up to 220 °C at a rate of 40 °C per min, at which point this temperature was maintained for 2 min and then cooled to initial conditions. The total run time was 7 min. The transfer line was maintained at 280°C and helium flow was 1 mL min⁻¹. For mass spectrometry detection, ionization was carried out by electronic impact (EI) with a voltage of 70 eV and full scan mode in the m/z range of 20–300 with an ion source temperature of 200 °C in positive ion mode. For quantification of nerolidol and farnesol (IS) characteristic ions for terpenes at m/z 93 and 161 were monitored by selected ion monitoring (SIM) mode as described previously for qualitative analysis [16,17]. The nerolidol standard used was a mixture of *cis*- and *trans*-nerolidol (1:3, w/w). *cis*-Nerolidol peak was used to evaluate the limit of detection (LOD) and lower limit of quantification (LLOQ). In order to quantify nerolidol in plasma from treated mice, the MS signals of both isomers were added to calculate the metabolite:internal standard ratio to construct the calibration curve and to report the total concentration of nerolidol in mouse plasma.

2.3. Sample preparation

Ten μ L of *n*-hexane and 10 μ L of an IS stock solution of 2 μ g/mL in *n*-hexane were added to a glass tube containing 0.1 mL of plasma at room temperature. Then, 200 μ L acetonitrile were added to precipitate proteins and samples were vigorously mixed for 3 min with a vortex followed by centrifugation at 1000 × g for 10 min at 4 °C. Supernatants were transferred to a new glass tube and 100 μ L of *n*-hexane were added. Samples were mixed with a vortex for 5 min and centrifuged at 1000 × g for 10 min at 4 °C. The *n*-hexane layer was transferred to a new glass tube and 5 μ L were injected for GC–MS analysis.

2.4. Evaluation of the analytical performance

The analytical performance of the method was based on the guidelines of the United States FDA for method validation [15].

2.4.1. Linearity

Calibration curves consisted of different concentrations of nerolidol added to pooled plasma from mice at a final concentration ranging from 0.010 to 5 μ g/mL. A blank sample (plasma from an animal that did not receive nerolidol and processed without IS) and a zero sample (plasma from an animal that did not receive nerolidol and processed with IS) were also analyzed. Ten μ L of IS solution (2 μ g/mL) were added to samples and processed as indicated in Section 2.3. The correlation between the nerolidol concentrations and the nerolidol:internal standard area ratio of MS signals detected by SIM were obtained with Origin[®] v8.5 software. Dynamic range (linearity) was determined by linear regression and was considered acceptable when linear coefficient correlation of Pearson[®] was equal or higher than 0.98. To determine the LOD and LLOQ, different concentrations of *cis*-nerolidol were added to pooled plasma from mice at a final concentration ranging from 0.05 to 50 ng/mL. LOD was defined as three times the signal-to-noise ratio and LLOQ was defined as 10 times the signal-to-noise ratio of *cis*-nerolidol. The detected signal of the IS was four times the signal-to-noise.

2.4.2. Matrix effect, precision and recovery

One replica of QC samples spike with nerolidol before extraction at 0.09, 2, and 4 μ g/mL were processed as described in Section 2.3 and analyzed on six different days to determine inter- and intra-day precision and accuracy. Assessment of matrix effect on nerolidol quantification was calculated by ratio between peak area values obtained in the test of intra-day precision and the peak area values of reference standard solutions of the same concentration without plasma.



Fig. 1. GC–MS chromatograms of (A) plasma from an animal that did not receive nerolidol and was processed without IS (blank), (B) plasma from an animal that did not receive nerolidol and was processed with IS, and (C) plasma from an animal that received a single oral dose of 1000 mg/kg of nerolidol three hours before blood sample collection and was processed with IS.

2.5. Animals

BALB/c mice were bred and housed in specific pathogen-free facilities of the Instituto de Ciências Biomédicas II (USP, Brazil). Experiments were performed in adult males, between 4 and 5 weeks of age. All animals were fed a standard diet and all procedures were in accordance with national regulations on animal experimentation adopted by the Brazilian Society of Animal Science Laboratory (SBCAL) and authorized by the Ethics Committee in Animal Experimentation (ECAE, ICB, USP), process no. 140/2009.

2.6. Quantification of nerolidol in mice plasma

Three male BALB/c mice, ranging from 4 to 5 weeks old and weighing $20\pm 2g$ received a single oral dose of 1000 mg/kg of nerolidol. The oral administration was done by gavage technique. Blood samples were taken at 30 min, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, and 12 h after oral dosing. Plasma was separated from blood cells by centrifugation at $3000 \times g$ for 10 min at 4 °C and stored at -20 °C for 72 h before being processed as indicated in Section 2.3. A one-way analysis of variance (ANOVA) and post-test comparison (Bonferroni *post hoc*) were used for statistical analysis. The Mann–Whitney test was used for comparison of different time points. GraphPad Prism[®]5 (GraphPad Software, California, USA) and Origin[®] v8.5 (OriginLab, Northampton, USA) software were used for data analysis.

3. Results and discussion

3.1. Optimization of the GC-MS conditions

Despite the broad use of nerolidol, most of the reported analytical techniques focus on detection and semi-quantification of this sesquiterpene from natural products [14,18]. For example, quantitative determination of nerolidol in tea bags by GC–MS has been previously reported using a headspace solid phase micro extraction and gas chromatography–flame ionization detection method [13]. The present study aimed to optimize a simple and robust GC–MS method to quantify nerolidol in plasma for preliminary quantification and assessment of biological interferences of nerolidol in mouse plasma after oral dosing to aid future malaria efficacy studies. The GC–MS chromatograms of *cis*–nerolidol, *trans*–nerolidol,

Table 1	
---------	--

Linear regression parameters of calibration curves of nerolidol in mouse plasma.

	Mean \pm SD ($n = 3$)
Slope	4.9 ± 0.2
Intercept	1.1 ± 0.6
Correlation coefficient (r)	0.994 ± 0.002

Tuble 2

Matrix effect of mouse plasma	on nerolidol quantification (n	=6)
-------------------------------	--------------------------------	-----

Concentration added (µg/mL)	Concentration detected (mean \pm SD, μ g/mL)	% related to standard solution	RSD (%)
0.09	0.093 ± 0.006	103.1	7.2
2	1.8 ± 7.4	92.6	3.7
4	3.36 ± 0.04	84.1	10.3

and IS are shown in Fig. 1. The retention time of *cis*-nerolidol, *trans*-nerolidol, and IS were 5.87, 5.98, and 6.61 min, respectively. The total run time for our method was only 7 min, which is shorter than those reported previously [13]. Farnesol was selected as the internal standard (IS) for its similarity in structure and molecular weight to nerolidol, having similar retention time and solubility in the extraction solvent. Nerolidol and farnesol were monitored by selected ion monitoring (SIM) mode at m/z 161 and m/z 93, the dominant and characteristic ions as reported previously [16,17] (Fig. 2).

3.2. Analytical performance

3.2.1. Linearity and sensitivity

The LOD, LLOQ, and linearity for nerolidol were evaluated using the optimized GC–MS method. The correlation coefficient (r) for all calibration curves was >0.99 indicating good correlation between the concentration and the metabolite:internal standard ratio of MS signals within the tested ranges (Table 1). Calibration curves were linear in the concentration range of 0.010–5 µg/mL nerolidol in mouse plasma. To determine LOD and LLOQ, different concentrations of *cis*-nerolidol were added to pooled plasma from mice at a final concentration ranging from 0.05 to 50 ng/mL. LOD was 0.0017 µg/mL while the LLOQ was 0.0035 µg/mL under the analytical conditions described above.



Fig. 2. Mass spectra of nerolidol and the IS (farnesol). (A) cis-Nerolidol and (B) trans-nerolidol at m/z 189 and (C) IS at m/z 197.

A.Y. Saito et al. / Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 111 (2015) 100-103

Table 3

Intra-day and inter-day precision and accuracy of nerolidol quantification in mouse plasma.

Concentration added (µg/mL)	Intra-day (n = 3)			Inter-day $(n=6)$		
	Concentration detected (mean±SD, μg/mL)	Precision (% RSD)	Accuracy (% RSD)	Concentration detected (mean \pm SD, μ g/mL)	Precision (% RSD)	Accuracy (% RSD)
0.09 2 4	$\begin{array}{c} 0.08 \pm 0.01 \\ 2.27 \pm 0.06 \\ 3.98 \pm 0.26 \end{array}$	12.2 8.6 6.7	8.9 13.9 0.4	$\begin{array}{c} 0.09 \pm 0.006 \\ 2.0 \pm 0.2 \\ 4.4 \pm 0.4 \end{array}$	7.6 11.6 10.2	0.2 1.1 9.3



Fig. 3. Nerolidol detected over time in plasma of animals treated with a single oral dose of 1000 mg/kg (n = 3).

3.2.2. Matrix effect, precision, and accuracy

The matrix effect and the possibility of ionization suppression or enhancement were evaluated. Matrix interference on nerolidol quantification in mouse plasma was determined using QC samples at low (0.09 μ g/mL), medium (2 μ g/mL), and high (4 μ g/mL) concentrations (Table 2). As indicated in Table 2, the highest matrix effect was observed at 4 μ g/mL of nerolidol (84.1%) as compared to an authentic standard solution of nerolidol in the absence of plasma. The precision (% of relative standard deviation, %RSD) was below 10.3% (Table 2), showing no significant ion suppression or enhancement due to the sample matrix (mouse plasma).

Intra-day precision (% RSD values) ranged between 6.7 and 12.2% (Table 3) and the accuracy ranged from 0.4 to 13.9%. Inter-day variation presented similar values to intra-day variation and ranged between 7.6 and 11.6%. The accuracy ranged from 0.2 to 9.3% (Table 3). The % RSD values were, in general, below 14%; thus, the method is reproducible and was successfully applied to nerolidol quantification in plasma from orally treated mice.

3.3. Quantification of nerolidol in mice plasma

The concentration of nerolidol in mouse plasma following a single oral dose of 1000 mg/kg reached the maximum concentration of $\sim 0.27 \pm 0.07 \,\mu$ g/mL within 30 min after administration and remained constant for up to 3 h after administration, reaching a maximum concentration of $\sim 0.35 \pm 0.05 \,\mu$ g/mL after 6 h of administration (Fig. 3). The concentration of nerolidol in plasma after 6 h was twice the *in vitro P. falciparum* IC₅₀ value (0.169 μ g/mL) [10]. Moreover, the maximum concentration detected was \sim 1460 times lower than the concentration required to induce 50% hemolysis (\sim 511 μ g/mL) [15]. After 12 h of oral administration, the concentration of nerolidol in plasma decreased to near zero. To our knowledge, this is the first report of nerolidol quantification in mouse plasma following oral dosing of 1000 mg/kg.

4. Conclusion

The present study aimed to develop a simple and fast GC–MS method for preliminary quantification and assessment of biological interferences of nerolidol in mouse plasma after oral dosing. The developed method is rapid, simple, and shows satisfactory analytical performance. The optimized GC–MS was successfully applied to the quantification of nerolidol in mouse plasma. Our quantitative assessment of nerolidol in mouse plasma will aid future efficacy and safety studies of nerolidol as a potential antimalarial. Moreover, our results revealed that the maximum concentration in mouse plasma after oral dosing was below the hemolytic concentration supporting its safety at the dose tested of 1000 mg/kg. On the other hand, the developed method is suitable for monitoring absorption of nerolidol from therapeutic formulations, cosmetics, and food.

Acknowledgements

A.Y.S. and R.A.C.S. contributed equally to this work. This study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 2014/23417-7) and Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq 476459/2013-3) (to A.M.K.), and the National Institutes of Health (Al108819 to M.B.C.). A.Y.S. and R.A.C.S. were recipients of FAPESP's fellowships. We would like to thank Dr. Janet Webster for comments and corrections.

References

- [1] G.R. Lang, G. Buchbauer, Flavour Fragr. J. 27 (2012) 13–39.
- [2] J. Koudou, A.A. Abena, P. Ngaissona, J.M. Bessiere, Fitoterapia 76 (2005) 700–703.
- [3] L.W. Wattenberg, Carcinogenesis 12 (1991) 151–152.
- [4] A. Lapczynski, S.P. Bhatia, C.S. Letizia, A.M. Api, Food Chem. Toxicol. 46 (Suppl. 11) (2008) S247–S250.
- [5] B.F. Brehm-Stecher, E.A. Johnson, Antimicrob. Agents Chemother. 47 (2003) 3357–3360.
- [6] A.C. Williams, B.W. Barry, Adv. Drug Deliv. Rev. 56 (2004) 603–618.
- [7] D.C. Arruda, F.L. D'Alexandri, A.M. Katzin, S.R. Uliana, Antimicrob. Agents Chemother. 49 (2005) 1679–1687.
- [8] S. Hoet, C. Stevigny, M.F. Herent, J. Quetin-Leclercq, Planta Med. 72 (2006) 480–482.
- [9] E. Nibret, M. Wink, Phytomed.: Int. J. Phytother. Phytopharmacol. 17 (2010) 911–920.
- [10] H. Rodrigues Goulart, E.A. Kimura, V.J. Peres, A.S. Couto, F.A. Aquino Duarte, A.M. Katzin, Antimicrob. Agents Chemother. 48 (2004) 2502–2509.
- [11] M.P. Silva, G.L. Oliveira, R.B. de Carvalho, D.P. de Sousa, R.M. Freitas, P.L. Pinto, J. de Moraes, Molecules 19 (2014) 3793–3803.
- [12] M. AbouLaila, T. Sivakumar, N. Yokoyama, I. Igarashi, Parasitol. Int. 59 (2010) 278–282.
- [13] C. Ma, Y. Qu, Y. Zhang, B. Qiu, Y. Wang, X. Chen, Food Chem. 152 (2014) 285–290.
- [14] S. Rodriguez, J. Kirby, C.M. Denby, J.D. Keasling, Nat. Protoc. 9 (2014) 1980–1996.
- [15] S.A. Mendanha, S.S. Moura, J.L. Anjos, M.C. Valadares, A. Alonso, Toxicol. In Vitro 27 (2013) 323–329.
- [16] S.A. Green, X. Chen, N.J. Nieuwenhuizen, A.J. Matich, M.Y. Wang, B.J. Bunn, Y.K. Yauk, R.G. Atkinson, J. Exp. Bot. 63 (2012) 1951–1967.
- [17] H.J. Bouwmeester, F.W. Verstappen, M.A. Posthumus, M. Dicke, Plant Physiol. 121 (1999) 173–180.
- [18] A. Williams, D. Ryan, A. Olarte Guasca, P. Marriott, E. Pang, J. Chromatogr. B: Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 817 (2005) 97–107.

III - Stabilization and detection of hydrophylloquinone as di-O-methyl derivative.

Elsevier Editorial System(tm) for Journal of Chromatography B Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Stabilization and detection of hydrophylloquinone as di-O-methyl derivative

Article Type: Short Communication

Keywords: Phylloquinone, hydrophylloquinone, redox, di-O-methyl derivative, HPLC, electrochemistry

Corresponding Author: Dr. Massuo J Kato, Professor

Corresponding Author's Institution: Research Support Center in Molecular Diversity of Natural Products, Institute of Chemistry, University of São Paulo, 05508-000, São Paulo - SP, Brazil, Av. Prof. Lineu Prestes, 748, São Paulo, SP 05508-000, Brazil.

First Author: Gerardo Cebrian-Torrejon, Ph.D.

Order of Authors: Gerardo Cebrian-Torrejon, Ph.D.; Rodrigo Antonio C Sussmann; Marcilio M de Moraes; Exequiel O Porta; Antonio Doménech-Carbó, Professor; Alejandro M Katzin, Professor; Massuo J Kato, Professor

Suggested Reviewers: Gilles J.C Basset Center for Plant Science Innovation, University of Nebraska-Lincoln, Lincoln, NE 68588, United States gbasset2@unl.edu

Chloë van Oostende Concordia University Richard J Renaud Science Complex, SP-553.05 7141 Sherbrooke Street West Montreal, Qc, Canada chloevanoostende@gmail.com

Leandro M de Carvalho Universidade Federal de Santa Maria – UFSM, Campus universitário, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil; lemacarvalho@gmail.com

Stabilization and detection of hydrophylloquinone as di-O-methyl derivative

Gerardo Cebrián-Torrejón^{a,*}, Rodrigo A. C. Sussmann^b, Marcilio M. de Moraes^a, Exequiel O. Porta^c, Antonio Doménech-Carbó^d, Alejandro M. Katzin^b, Massuo J. Kato^{a,*}

^aResearch Support Center in Molecular Diversity of Natural Products, Institute of Chemistry, University of São Paulo, 05508-000, São Paulo - SP, Brazil, Av. Prof. Lineu Prestes, 748, São Paulo, SP 05508-000, Brazil.

^bDepartment of Parasitology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, Av. Prof. Lineu Prestes, 1374, São Paulo, SP 05508-000, Brazil.

^cInstituto de Química Rosario (IQUIR-CONICET), Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, Suipacha 531, S2002LRK Rosario, Argentina.

^dDepartament de Química Analítica, Facultat de Química, Universitat de València, Dr. Moliner 50, 46100 Burjassot, Valencia, Spain.

* e-mail: majokato@ig.usp.br, gerardo.cebrian@usp.br.

Abstract

Phylloquinone is a redox active naphthoquinone involved in electron transport in plants. The function of this reduced form remains controversial due to its instability and consequent difficult detection. Herein, a simple method that permits the stabilization of the reduced form of phylloquinone by di-O-methylation is described making possible the analysis of this compound.

Highlights

- Controversial characterization of the hydrophylloquinone.
- A method to stabilize hydrophylloquinone by di-O-methylation was developed.
- Chromatographics methods to detect di-O-methyl-hydrophylloquinone were developed.
- We analyzed phylloquinone and its reduced derivative by chromatographic and electrochemical methods.

Keywords

Phylloquinone, hydrophylloquinone, redox, di-O-methyl derivative, HPLC, electrochemistry

1. Introduction

Phylloquinone (1) (2-methyl-3-phytyl-1,4-naphthoquinone, vitamin K1) is a bifunctional molecule composed by a redox active naphthoquinone ring and a lipid soluble phytyl side chain (Fig. 1). The phylloquinone has a vital function in plants mediating electron transport in photosystem I [1]. The transfer of one electron, therefore, involves the quinone and semiquinone forms of phylloquinone, and usually occurs in the nsec time scale. The rate quinone / semiquinone (1:2) is classically studied by electron paramagnetic resonance [2]. Recently, other hypotheses for the functions of phylloquinone (1) in plants beyond electron transport were raised. The reduced form of vitamin K1 (1), vitamin K1 hydroquinone (KH₂, **2**), was detected in smaller quantities in *Arabidopsis* leaves kept under light when compared with those kept in the dark. The authors suggest that the KH₂ (**2**) probably is not related to the photoactive pool of phylloquinone (**1**) and is involved in chlororespiration [3]. Other studies show that approximately 50% of the total phylloquinone (**1**) is not associated
with photosystem I [4,5]. In vertebrates phylloquinone (1) is known as a cofactor for some carboxylases that convert specific glutamate residues on target proteins to γ carboxyglutamates (Gla) [6] which are involved in blood coagulation, bone homeostasis and the maintenance of vascular integrity [7,8]. In the process, vitamin K1 (1) is converted to vitamin K1 epoxide, which must be recycled to KH₂ (2) for complete the vitamin K1 cycle. This reduction is catalyzed by a vitamin K epoxide reductase (VKOR) [9]. This form (2) has been described as a potent biological antioxidant [10,11]. Furthermore, Mukai *et al.* [12,13] reported that KH₂ (2) has a greater capacity than ubihydroquinone-10 (Q₁₀H₂) to regenerate α -tocopherol (α -T) from the α -tocopheryl radical (α -T•) resulting from the major physiological free radical scavenging pathway.

Although the studies above have characterized the different forms of phylloquinone (1), the characterization of the KH_2 (2) remains controversial due to its instability. Oostend and collaborators [3] described a protocol which employs sodium borohydride or sodium hydrosulfite as reducing agent of vitamin K1 (1) in order to obtain the reduced form KH_2 (2) as an standard with a reoxidation rate of 3% per day. Furthermore, the authors suggest the immediately analysis of the samples because KH_2 (2) is only detectable few minutes after extractions.

In this paper we describe a straightforward and fast method to stabilize KH_2 (2) and to determine its content by TLC, HPLC and GCMS, allowing the analysis of the real content of this compound.

2. Materials and methods

2.1. General experimental procedures

Reaction was monitored by thin layer chromatography (TLC) carried out on Merck Kieselgel silica gel plates (60F-254) using UV light as the visualizing agent and hexanes:ethyl acetate (9:1) as mobile phase. In order to reveal the compounds we immerse the TLC plate in a solution of 15% of H_2SO_4 in ethanol and heat it at 100 °C.

2.2. Obtention of di-O-methylated vitamin K hydroquinone (KH₂) derivative 3

Phylloquinone (1) (R_f (hexanes:ethyl acetate 9:1): 0.78) (1 eq., 0.044 mmole, 20 mg, 20 μ L) was dissolved in 5 mL of anhydrous tetrahydrofuran (THF) under nitrogen atmosphere (N₂), resulting in a yellow solution. Zinc (4 eq., 0.177 mmole, 11.6 mg) was added to the reaction solution followed by an excess of acetic acid (0.5 mL), resulting an uncolored solution. The formation of **3** was monitored by HPLC and GC/MS by aliquot extractions and after 30 minutes an excess of KOH (20 eq., 0.97 mmole, 54.7 mg) was added and then after 10 minutes MeI (20 eq.,0.97 mmole, 137.68 mg, 60.6 μ L) was added. The reaction was stirred overnight, in the dark, at room temperature. The reaction mixture was diluted with water (5 mL) and extracted with dichloromethane (3 x 5 mL). The organic phase was dried over anhydrous Na₂SO₄ and rotaevaporated yielding a yellow oil containing the compound **3** (R_f 0.8 in hexanes:ethyl acetate 9:1 (20 mg, 99%).

2.3. GC/MS analysis

A mass spectrometer electron impact Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) model Trace GC and mass spectrometer Y2K ion trap (MS) PolarisQ System (Finnigan, ThermoQUEST Inc., San Jose, CA), with a data analysis program (Xcalibur version 1.3) was used. The device was equipped with a TR-1MS column (30 m, 0.25 mm 0.25 μm, Thermo Scientific, USA). The injector temperature was 220°C, equipped with a split less liner, and kept at an initial oven temperature of 100°C for 2 minutes and increased to 300°C at a rate of 25°C/min. This temperature was maintained for 10 minutes and then cooled to initial conditions. The transfer line was maintained at 260°C and helium flow was 1.5 mL/min. The mass spectrometer was operated in positive mode with ion source at 200°C. The mass range monitored was m/z 40 to 500 (Full

scan) (Figs. 2 and 3). The ions used to identify vitamin K1 and its derivatives were at m/z 450 for phylloquinone (1), at m/z 452 for KH₂ (2) and at m/z 480 for di-*O*-methylated hydrophylloquinone (3).

2.4. High performance liquid chromatography (HPLC) analysis

Vitamin K1 (1) and its derivatives were analyzed in a HPLC Gilson 322 pump, using a Phenomenex Luna C18 column (250 mm x 4.6 mm x 5 μ m) (Phenomenex, CA, USA) coupled with a C18 pre-column (Phenomenex, CA, USA), a Diode Array detector (DAD) Gilson 170 and a FC203B fraction collector (Fig. 4). The software used for data processing was the Trilution LCTM 3.0 Software System. A gradient elution with methanol (solvent A) and acetonitrile (solvent B) was used at a flow rate of 1 mL/min. The gradient starts at 0 minutes 50/50% (A/B), increasing to 30/70% (A/B) in 28 minutes and returning to 50/50% (A/B) in 2 minutes, equilibrating for additional 30 minutes.

2.5. Electrochemical study of phylloquinone

Electrochemical measurements (Fig. 5) were performed at 298±1 K in a thermostatic cell with a CH 660I equipment. A BAS MF2012 glassy carbon working electrode (GCE) (geometrical area 0.071 cm²), a platinum wire auxiliary electrode and a AgCI (3M NaCI)/Ag reference electrode were used in a conventional three-electrode arrangement. Cyclic and square wave voltammetries (CV and SWV, respectively) were used as detection modes. Derivative convolution of data was performed for increase peak resolution.

Thin film of vitamin K1 (1) on glassy carbon electrode was prepared according to reported procedure [13], by pipetting 10 μ L of the liquid vitamin in ethanol and allowing the solvent to evaporate in air. As a result, a uniform, fine coating of the solid was adhered to the basal electrode. Aqueous 0.10 M potassium phosphate buffer

saline (PBS) at physiological pH, previously degasified by bubbling Argon for 10 min, was used as a supporting electrolyte.

3. Results and Discussion

In order to stabilize the hydrophylloquinone (2) the quinone moiety of vitamin K1 (1) was reduced to hydrophylloquinone form 2 (Fig. 1) using Zn and acetic acid [14]. Then, both phenolic hydroxyls were methylated using methyl iodine catalized by KOH producing the di-*O*-methyl hydrophylloquinone (3) (Figs. 2-4).

The cyclic voltammetry response of a vitamin K1 (1) film on GCE in contact with PBS at physiological pH (Fig. 5). The potential scan was initiated at -0.25 V vs. Ag/AgCl in the positive direction in order to test the presence of vitamin K1 (1) as its reduced form **2**. As can be seen in the initial-going scan, no anodic peaks were detected indicating the purity of the quinone form. In the subsequent cathodic scan (Fig. 5), a reduction peak was recorded at -0.54 V (C₁) coupled, in the following anodic scan, by an oxidation peak at -0.04 V (A₁). The peak C₁ can unambiguously be attributed to the proton-assisted reduction of the quinone form of vitamin K1 (1) to its phenolic form (**2**) (Figs. 1 and 5).

The chemical method developed was able to stabilize the KH_2 (2) as di-Omethylated derivative (3) that remains stable during several months (*pers. obs.*). This result is supported by the previous work developed with vitamin KH_2 (2) [3]. Stabilizing the reduced form of vitamin K1 (2) by the methylation of the phenolic hydroxyls (3) the reoxidation of 2 is avoid, because 3 will not be reoxidized, providing new and reliable analytical tool for further research of this understudied metabolite (2).

Acknowledgements

The authors acknowledge CNPq, FAPESP (2009/51850-9) and the Spanish "I+D+I MEC" project CTQ2011-28079-CO3-02, supported by ERDF funds, for the financial support.

GC-T and RACS contributed equally to this work. GC-T is fellow from CNPq (Brazil), RACS is fellow from FAPESP (Brazil) and EOP is fellow from CONICET (Argentina).

References

- K. Sigfridsson, O. Hansson, P. Brzezinski, Proc Natl Acad Sci U S A 92 (1995) 3458-3462.
- W. Xu, P. Chitnis, A. Valieva, A. van der Est, Y.N. Pushkar, M. Krzystyniak, C. Teutloff,
 S.G. Zech, R. Bittl, D. Stehlik, B. Zybailov, G. Shen, J.H. Golbeck, J Biol Chem 278 (2003) 27864-27875.
- [3] C. Oostende, J.R. Widhalm, G.J. Basset, Phytochemistry 69 (2008) 2457–2462.
- [4] J. Gross, W.K. Cho, L. Lezhneva, J. Falk, K. Krupinska, K. Shinozaki, M. Seki, R.G. Herrmann, J. Meurer, J Biol Chem 281 (2006) 17189–17196.
- [5] A. Lohmann, M.A. Schottler, C. Brehelin, F. Kessler, R. Bock, E.B. Cahoon, P. Dormann, J Biol Chem 281 (2006) 40461-40472.
- [6] M.M. Ulrich, B. Furie, M.R. Jacobs, C. Vermeer, B.C. Furie, J Biol Chem 263 (1988) 9697–9702.
- [7] C. Vermeer, M.J. Shearer, A. Zittermann, C. Bolton-Smith, P. Szulc, S. Hodges, P.
 Walter, W. Rambeck, E. Stocklin, P. Weber, Eur J Nutr 43 (2004) 325-335.
- [8] L.J. Schurgers, M.J. Shearer, K. Hamulyak, E. Stocklin, C. Vermeer, Blood 104 (2004) 2682-2689.

[9] P.H. Chu, T.Y. Huang, J. Williams, D.W. Stafford, Proc Natl Acad Sci U S A 103 (2006) 19308-19313.

- [10] J. Li, J.C. Lin, H. Wang, J.W. Peterson, B.C. Furie, B. Furie, S.L. Booth, J.J. Volpe,P.A. Rosenberg, J Neurosci 23 (2003) 5816–5826.
- [11] L.M. Vervoort, J.E. Ronden, H.H. Thijssen, Biochem Pharmacol 54 (1997) 871-876.
- [12] K. Mukai, S. Itoh, H. Morimoto, J Biol Chem 267 (1992) 22277-22281.
- [13] K. Mukai, H. Morimoto, S. Kikuchi, S. Nagaoka, Biochim Biophys Acta 1157 (1993) 313-317.
- [14] A.P. Marchand, G.M. Reddy, Synthesis-Stuttgart (1991) 198-200.

Figures



Reaction conditions: i) Zn, Acetic acid, THF; ii) KOH, Mel.





Fig. 2. HPLC profile of vitamin K1 and its derivatives. Vitamin K1 hydroquinone (KH₂, **2**, Rt 34.6 min), vitamin K1 (**1**, Rt 37.2 min), and di-*O*-methyl hydrophylloquinone (**3**, Rt 48.2 min). Red line corresponds to solvent A proportion.



Fig. 3. GC profile of vitamin K1 and its derivatives. **A** at 16.3 min vitamin K1 (**1**), **B** at 16.2 min vitamin K1 hydroquinone (KH_{2} , **2**) and **C** at 17.8 min di-*O*-methyl hydrophylloquinone (**3**).



Fig. 4. Mass spectra (EI) of vitamin K1 and its derivatives. **A**: vitamin K1 (**1**), **B**: vitamin K1 hydroquinone (KH₂, **2**) and **C**: di-O-methylated hydrophylloquinone derivative (**3**).



Fig. 5. Cyclic voltammogram, after semi-derivative convolution, of a vitamin-K (1) film on glassy carbon electrode immersed into 0.10 M PBS, pH 7.4. Potential scan initiated at -0.25 V in the positive direction; potential scan rate 50 mV/s.