MIRIAM YUKIKO MATSUMURA

**Investigação bioquímica da ocorrência da biossíntese
de vitamina K e retinóides no ciclo intraeritrocitário do
*Plasmodium falciparum***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências (Biologia da relação patógeno-hospedeiro).

São Paulo
2008

MIRIAM YUKIKO MATSUMURA

**Investigação bioquímica da ocorrência da biossíntese
de vitamina K e retinóides no ciclo intraeritrocitário do
*Plasmodium falciparum***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração:
Biologia da relação patógeno-hospedeiro

Orientador:
Prof. Dr. Alejandro Miguel Katzin

São Paulo
2008

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

© reprodução total

Matsumura, Miriam Yukiko.

Investigação bioquímica da ocorrência da biossíntese de vitamina K e retinóides nos estágios intraeritrocitários do *Plasmodium falciparum* / Miriam Yukiko Matsumura. -- São Paulo, 2008.

Orientador: Alejandro Miguel Katzin.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Parasitologia. Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. Linha de pesquisa: Biossíntese de vitamina K e retinóides no *Plasmodium falciparum*.

Versão do título para o inglês: Biochemical investigation of occurrence of retinoids and vitamin K biosynthesis in intraerythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*.

Descritores: 1. Malária 2. *Plasmodium falciparum* 3. Vitamina A 4. Vitamina K I. Katzin, Alejandro Miguel II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. III. Título.

ICB/SBIB144/2008

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Miriam Yukiko Matsumura.

Título da Dissertação: Investigação bioquímica da ocorrência da biossíntese de vitamina K e retinóides nos estágios intraeritrocitários do *Plasmodium falciparum*.

Orientador(a): Alejandro Miguel Katzin.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 - telefax : (55) (011) 3091 7438
e-mail: cep @icb.usp.br

CERTIFICADO DE ISENÇÃO - CEP SH

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB Nº 240/07, referente ao projeto intitulado: "*Caracterização Bioquímica de carotenóides vitaminas K e E nos estágios intraeritrocíticos de P. falciparum* " sob a responsabilidade de MIRIAM YUKIKO MATSUMURA, foi analisado na presente data pela CEP SH - COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não envolve manipulação humana que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por esta Comissão.

São Paulo, 22 de novembro de 2007.

Prof. Dr. LUIZ VICENTE RIZZO
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB /USP

Aos meus queridos pais.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho contou com a colaboração direta e indireta de muitas pessoas, e talvez eu nunca consiga retribuir essa ajuda, mas deixo registrada minha gratidão:

Ao Alejandro M. Katzin, pela orientação, pela oportunidade do contato com o mundo da pesquisa, por sua paciência e seu espírito positivo e incentivador.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelos auxílios financeiros.

Ao Fábio D’Alexandri e à Renata Tonhosolo que ensinaram muito e me ajudaram no desenvolvimento dos experimentos. E também pelos momentos de descontração, divertidos e filosóficos. À Fabiana M. Jordão que ajudou participando das discussões, me dando dicas e compartilhando conhecimentos, os bons e maus momentos. À Sara Machado e à Nayara B. F. Carvalho, com as quais não pude conviver muito, mas espero manter o que foi conquistado.

À Emília A. Kimura, pelas correções e contribuição nas discussões, por suas colocações racionais que me ajudaram a crescer; e à Valnice Peres, pelo auxílio nos experimentos, por me ensinar a trabalhar na cultura, sempre com seu jeito amável.

Aos técnicos: Márcio M. Yamamoto, Wolfgang Fisher e Manoel Peres, que me deram muitas dicas e me ajudaram em momentos de dificuldades operacionais.

Aos membros da banca da qualificação: Profa. Silvia R. B. Uliana, Prof. Arthur Gruber e Profa. Débora Y. A. C. dos Santos.

Ao Fernando A. L. Franco e Letusa Albtrech, que me auxiliaram no cultivo bacteriano para extração de ubiquinona.

Ao Prof. Fabio C. Gozo e sua equipe, pelas análises no Q-TOF.

À Profa. Adriana Mercadante e sua aluna Veridiana V. de Rosso, pelas cromatografias em coluna C30.

Aos amigos e colegas do departamento, pelas dicas sobre o mestrado, sobretudo pelos momentos de descontração. Destaco entre eles o Danilo M. Ciccone, pelas ajudas, socorros, e pelas conversas.

Às secretárias Wilma G. de Souza e Ângela C. de Jesus, por me ajudarem na resolução de dúvidas e problemas burocráticos.

Aos amigos de fora do departamento, pela amizade e alegria proporcionadas.

À amiga Paula C. G. Onofre, pelas discussões sobre o trabalho, pelo apoio moral, pelos momentos de descontração, e pela grande amizade.

Ao Roberto B. Cordeiro, pelo incentivo na decisão de fazer o mestrado, pelo apoio no seu desenrolar, mas principalmente pelo carinho, e compreensão.

Aos meus pais, pelo amor e apoio que nunca faltaram.

À Deus, pela força e paciência nos momentos necessários, e pelas oportunidades nos momentos mais adequados.

RESUMO

Matsumura MY. Investigação bioquímica da ocorrência da biossíntese de vitamina K e retinóides nos estágios intraeritrocitários do *Plasmodium falciparum* [Dissertação]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2008.

A malária é uma das principais doenças parasitárias no mundo, e o aumento da resistência aos antimaláricos atualmente utilizados dificulta o controle dessa parasitose. Assim, é de interesse a descoberta de novas vias metabólicas que sirvam de alvos para o desenvolvimento de drogas para combater essa doença. Nosso laboratório, nos últimos anos, tem investido na caracterização de intermediários e produtos finais da via de isoprenóides. Baseando-se na presença das vias 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato e do Chiquimato, decidimos verificar se ocorriam as biossínteses de retinóides e vitamina K no ciclo intraeritrocitário do *P. falciparum*, através da análise de produtos metabolicamente marcados com [1(n)-³H]-pirofosfato de geranilgranila por análises cromatográficas (HPLC e TLC), além da espectrometria de massas. Não identificamos a presença de retinal, retinol e ácido retinóico no ciclo intraeritrocitário do *P. falciparum*. Já a biossíntese de vitamina K precisa ser estudada com mais profundidade, pois há indícios de biossíntese, em especial da menaquinona-4.

Palavras-chave: Malária; *Plasmodium falciparum*; Vitamina K; Vitamina A.

ABSTRACT

Matrumura MY. Biochemical investigation of occurrence of retinoids and vitamin K biosynthesis in intraerythrocytic stages of *Plasmodium falciparum* [Masters Thesis (Parasithology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Univerdidade de São Paulo; 2008.

Malaria is one of the most important parasitic diseases in the world. The spread of resistance to the antimalarials impairs the parasite's control. Therefore, is necessary the discovery of new metabolic routes to allow new antimalarials development. Our group has been studying the isoprenoid pathway, characterizing the intermediate and secondary products of this pathway. Based on the presence of 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate and shikimate pathways, we decided to investigate the occurrence of retinoids and vitamin K biosynthesis in *P. falciparum*, through the chromatography of [1(n)-³H]Geranylgeranylpyrophosphate labeled products of intraerythrocytic stages of *P. falciparum*, and mass espectometry analysis. The retinal, retinol and retinoic acid were not identified in *P. falciparum*. The results indicate the menaquinone-4 biosynthesis, although deeper investigation is necessary.

Key-words: Malaria; *Plasmodium falciparum*; Vitamin K; Vitamin A.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Malária	13
1.2 Breve histórico	13
1.3 Situação atual	16
1.3.1 No mundo	16
1.3.2 No Brasil	17
1.4 Ciclo	17
1.5 Apicoplasto	19
1.6 Via do metil eritritol fosfato (MEP)	20
1.7 Via do Chiquimato	21
1.8 Produtos finais das vias MEP e/ou do chiquimato em estudo no <i>Plasmodium falciparum</i>	24
1.8.1 Vitaminas	24
1.8.1.1 Vitamina A	24
1.8.1.2 Vitamina K	25
2 OBJETIVOS	28
3 METODOLOGIA	30
3.1 Cultura in vitro de <i>Plasmodium falciparum</i>	31
3.2 Sincronização da cultura	31
3.3 Marcações metabólicas	31
3.4 Método de obtenção de Coenzima Q ₈	32
3.5 Cromatografias das vitaminas A e K	33
3.6 Cuidados no processamento das vitaminas	34
3.7 Vitamina A	34
3.7.1 Extração de vitamina A	34
3.7.2 Análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	36
3.7.3 Análises por cromatografia em camada delgada (TLC)	36
3.7.4 Cromatografia por HPLC e recromatografia em TLC	37
3.7.5 Cromatografia por TLC e recromatografia em HPLC	37
3.7.6 Espectrometria de massas por pulverização ionizante (ESI-MS)	38
3.7.7 Espectrometria de massas Q-TOF	39
3.8 Vitamina K	40
3.8.1 Extração	40
3.8.2 Análise da biossíntese de vitamina K por cromatografia em HPLC	40
3.8.3 Análise da biossíntese de vitamina K por cromatografia em TLC	41
3.8.4 Análise por cromatografia em HPLC e recromatografia em HPLC ou TLC	42
3.8.5 Espectrometria de massas por pulverização ionizante (ESI-MS)	42
3.9 Testes de inibição	43
3.9.1 Glifosato	43
4 RESULTADOS	45
4.1 Vitamina A	46
4.1.1 Análise da biossíntese de retinóides por HPLC	46
4.1.2 Análise da biossíntese de retinóides por cromatografia em TLC	47
4.1.3 Extração em fase sólida, TLC 2D e HPLC para análise do ácido retinóico	51
4.1.4 Espectrometria de massas Q-TOF	53
4.2 Vitamina K	54
4.2.1 Análise da biossíntese de vitamina K por HPLC	54

4.2.2 Espectrometria de massas	58
4.3 Padronização da metodologia.....	63
4.3.1 Vitamina A.....	63
4.3.1.1 Padronização dos métodos de HPLC para vitamina A	63
4.3.1.2 Padronização de método para TLC de vitamina A	66
4.3.1.3 Padronização da quantidade de parasitos	66
4.3.1.4 Espectrometria de massas	68
4.3.1.5 Definição do precursor radioativo	71
4.3.1.6 Associação de cromatografias para análise de retinóides.....	73
4.3.2 Vitamina K.....	74
4.3.2.1 Padronização da cromatografia por HPLC.....	75
4.3.2.2 Análise da biossíntese de vitamina K por cromatografia em TLC e recromatografia em HPLC	76
4.3.2.3 Análise da biossíntese de vitamina K por cromatografia em HPLC e recromatografia em HPLC ou TLC	78
4.3.2.4 RP-TLC	81
4.3.2.5 Espectrometria de massas	84
4.3.2.6 Microteste- glifosato	86
5 DISCUSSÃO	88
5.1 Retinóides	90
5.2 Vitamina K.....	93
5.2.3 Inibição.....	97
6 CONCLUSÕES	99
6.1 Retinóides	100
6.2 Vitamina K.....	100
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101

1 INTRODUÇÃO

1.1 Malária

A malária é uma doença parasitária causada por protozoários do gênero *Plasmodium*. É uma doença muito antiga e ainda hoje representa um grande flagelo à saúde pública e um empecilho ao desenvolvimento econômico das regiões endêmicas.

1.2 Breve histórico

Acredita-se que a evolução do plasmódio tenha acompanhado a evolução humana. Sua origem ainda é discutida, as duas principais teorias são que teria se desenvolvido a partir de adaptação de Coccídios do epitélio intestinal para tecidos de órgãos internos e células sanguíneas, ou através de uma transferência lateral de parasitos de outros vertebrados (1). Provavelmente tenha surgido na África e então espalhada pelo mundo junto das migrações humanas. A primeira descrição sobre detalhes clínicos e complicações da doença foi feita por Hipócrates, na Grécia, durante o século V antes de Cristo. Os relatos anteriores a Hipócrates associavam a doença aos castigos divinos (2).

A malária já era comum no período do Império Romano e Grego, mas também ocorria na Itália e outras partes da Europa. A associação dos episódios de febre com águas paradas e regiões pantanosas levou ao desenvolvimento de métodos de drenagem que eram praticados por gregos, romanos já no século VI antes de Cristo, e foi mantido durante a Idade Média na Itália, França, Holanda, Inglaterra e outras regiões. A relação entre o ar úmido de regiões pantanosas e os episódios de febre originou o nome italiano “mal’aria”, que significa ar ruim (2).

Ainda não há concordância sobre a introdução da malária no Novo Mundo. A teoria mais aceita é que a introdução tenha ocorrido no início do século XVII. O *P. vivax* teria sido transportado do sudeste da Ásia para as colônias americanas em Jamestown e Virginia, enquanto o *P. falciparum* teria sido introduzido na América Central, proveniente da África junto dos escravos africanos (3). Mas em um outro trabalho, de Joy *et al.* (4), é mostrado através da análise de DNA mitocondrial, que

as populações de *Plasmodium* da Ásia, América do Sul e Papua Nova Guiné são mais antigas (50.000 a 100.000 anos atrás) que o evento de expansão genético na África, sugerindo que o parasito migrou da África antes da recente expansão ocorrida neste continente, talvez durante o Pleistoceno, acompanhando a expansão dos humanos (4).

A malária se tornou uma doença tropical apenas recentemente. No início do século 20 devastava muitos países no Oeste da Europa, no norte da Ásia e na América do Norte, como ilustrado na figura 1 (5).

Figura 1. Distribuição global da malária no período 1900-2002. Envolvendo os casos de malária causados pelas 4 espécies, incluindo áreas de alta e baixa transmissão. Retirado de Hay, *et al.* (6).

O declínio da malária nos EUA e no norte da Europa começou em meados do século XIX, em parte por causa do uso da drenagem na agricultura. Adicionalmente, melhores condições de moradias, diagnóstico médico, aumento da disponibilidade de quinino e melhorias na educação e economia contribuíram para erradicação nessas áreas (7).

Após a segunda Guerra Mundial a OMS reconheceu que a malária além de contribuir em grande escala na mortalidade mundial também interferia no

desenvolvimento agrícola e industrial. Um programa de erradicação da malária foi aprovado em 1955, e em 1957 a OMS começou a coordenar as atividades e promover assistência técnica. O programa foi aplicado em todos os países com malária nas Américas e na Europa, e na maioria dos países da Ásia e Oceania. Mas apenas projetos pilotos foram aplicados na África por causa da magnitude da transmissão e falta de infraestrutura (2). O projeto envolvia o uso de inseticidas para interromper a transmissão e distribuição de antimaláricos para o controle da doença.

No início dos anos 70 a malária havia sido eliminada de toda Europa, Ásia e parte da antiga URSS, diversos países do Oriente Médio, maior parte da América do Norte e grandes áreas do nordeste e porções sudestes da América do sul (2). O programa teve mais sucesso nas regiões temperadas, onde a transmissão ocorria de forma epidêmica e instável (7).

Com o tempo, os parasitos desenvolveram resistência aos antimaláricos utilizados, e os vetores ao DDT (dicloro-difenil-tricloroetano), o principal inseticida no programa. O DDT ainda foi removido do mercado nos EUA por motivos ambientais. Os pesticidas alternativos não tiveram grande aceitação pelo preço elevado e menor eficiência. Na metade do século XVII havia um consenso que a erradicação não funcionaria em muitas áreas, e em 1969 o objetivo foi revisado, e o programa de erradicação foi modificado para programa de controle. No início dos anos 1970s muitos dos recursos destinados para erradicação foram transferidas para outras prioridades (7).

A eliminação da malária em parte da Europa e nos Estados Unidos junto com a falha do programa de erradicação global levou à perda de interesse pela malária no fim dos anos 70 até início dos anos 90 (8).

1.3 Situação atual

1.3.1 No mundo

Dessa forma, o cenário atual é um predomínio da malária em regiões tropicais, com um quadro mais deteriorado na África Sub-Saariana, mas há uma tendência de aumento das regiões endêmicas, intensificado pelo problema da resistência aos antimaláricos e pesticidas.

Estima-se que essas áreas endêmicas abrigue cerca de 40% da população mundial, e que ocorram anualmente cerca de 500 milhões de casos, e até 2,7 milhões de mortes (9). A malária continua sendo um problema de saúde importante em algumas regiões da América do Sul e da Ásia, e principalmente na África sub-saariana, que abriga 90% dos casos da malária, a maioria delas englobando crianças de até cinco anos de idade e gestantes (10). Os riscos associados nas infecções em gestantes incluem baixo peso, abortos espontâneos e mortalidade materna, isso porque a placenta é um local de seqüestro do *P. falciparum*, e parece ser um local privilegiado para multiplicação do parasito além da perda da imunidade adquirida pelos adultos durante a gestação. No caso das crianças de até cinco anos, a alta taxa de mortalidade entre crianças decorre do lento desenvolvimento de imunidade (8, 11).

Regiões endêmicas, como na África sub-saariana, a malária representa um problema inclusive o desenvolvimento econômico, por diminuir o período ativo do trabalhador, requerer maior investimento do governo na saúde, e reduzir o contingente de trabalhadores por deixar muitos indivíduos com seqüelas.

O agravamento da situação mundial da malária tem como algumas causas a instabilidade climática, os problemas no tratamento pelos deslocamentos de contingentes em consequência de guerra e revoltas civis, a AIDS, e a resistência aos antimaláricos atualmente utilizados (8). Mas o fator que mais contribui para deterioração da situação é o aumento da resistência aos antimaláricos (1, 8).

Atualmente morrem mais pessoas pela malária do que há 30 anos, e ela está retornando às áreas em que já fora erradicada, além de invadir novas áreas, como nordeste da Europa oriental e Ásia central (10).

1.3.2 No Brasil

No Brasil, durante a década de 50, os programas de controles alcançaram o êxito de reduzir em 100 vezes os 5 milhões de casos anuais. Porém, nos 20 anos seguintes, o desenvolvimento não planejado da região amazônica causou uma grande migração para esta área, expondo um grande contingente não imune à malária, o que resultou em mais de 700 mil casos reportados em 1991. (10, 12, 13). Atualmente aproximadamente 99% dos casos de malária do Brasil ocorrem na região Amazônica, o que representou quase 601 mil casos em 2005. A maior parte dos casos de malária no Brasil é causada pelo *P. vivax*, mas a incidência de casos causados pelo *P. falciparum* está aumentando, o que é motivo de preocupação, pois este aumento favorece a ocorrência de casos mais graves e maior número de óbitos (14).

1.4 Ciclo

Laveran foi o responsável pela descoberta do plasmódio, ao observá-los nos eritrócitos humanos e foi o primeiro a descrevê-lo, em 1880. Os plasmódios pertencem à família Plasmodiida. Existem quase 100 espécies de plasmódios, que causam infecções em diversas espécies, mas somente quatro são responsáveis pela infecção humana. São eles: *Plasmodium vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. falciparum*

Ronald Ross em 1897 observou a presença do plasmódio no estômago e nas glândulas salivares dos mosquitos que se alimentavam do sangue de pássaros infectados com a forma aviária da malária, e associou a transmissão a vetores invertebrados. A transmissão ocorre através do repasto sanguíneo de vetores invertebrados, as fêmeas se alimentam do sangue para maturação dos ovos. A transmissão em humanos ocorre apenas por fêmeas do gênero *Anopheles*, e essa descoberta foi feita por Patrick Manson e colegas em 1900 (2, 5).

Existem cerca de 400 espécies de anofelinos, mas apenas 60 são vetores naturais da malária. Quando as fêmeas dos anofelinos picam uma pessoa infectada pela malária, formas sexuais do parasito (gametócitos) são liberadas na luz do

intestino do mosquito. Os gametas produzidos são liberados e geram um zigoto, que se diferencia em uma forma móvel denominada oocineto, este se locomove e penetra na lâmina basal intestinal, originando o oocisto. O oocisto é caracterizado por possuir uma cápsula grossa. No interior do oocisto ocorrem muitas divisões nucleares, a primeira meiótica e as subseqüentes mitóticas, dando origem a milhares de esporozoítos, e posteriormente essas formas infectantes migram para as glândulas salivares do mosquito, sendo liberados durante um novo repasto sanguíneo em um novo hospedeiro intermediário. Os esporozoítos alcançam o fígado, invadem os hepatócitos, originando a forma denominada criptozoíta, estes crescem e realizam a esquizogonia pré-eritrocítica, nome dado à fase por preceder a fase de esquizogonia sanguínea. O tempo do ciclo nos hepatócitos depende da espécie, sendo em média 6 dias para o *P. falciparum*, 10 dias para *P. vivax* e 15 dias para *P. ovale* e *P. malariae*. Os merozoítos da esquizogonia pré-eritrocítica são então liberados pelo rompimento dos hepatócitos, e os que escapam da defesa promovida pelas células de Kupffer, presentes no fígado, e conseguem invadir as hemácias iniciam o ciclo intra-eritrocitário, alvo da maior parte das drogas antimalárias, por ser responsável pela morbidez da doença. O ciclo intra-eritrocitário envolve três fases: trofozoíto jovem, trofozoíto maduro e esquizontes, e o tempo para completá-lo é característico em cada espécie, sendo de 36 a 48 horas em *P. falciparum*, 48 horas em *P. vivax* e *P. ovale*, e 72 horas em *P. malariae*. A esquizogonia no ciclo intra-eritrocitário origina novos merozoítos, que são liberados na corrente sanguínea através do rompimento da hemácia, e podem invadir outras hemácias. Em geral, a esquizogonia se processa de forma sincrônica, e dessa forma, os merozoítos são liberados ao mesmo tempo, juntamente com materiais pirogênicos, que são restos do metabolismo da hemoglobina, processada pelo parasito, e que induzem os picos de febre e outros sintomas clínicos. Alguns trofozoítos diferenciam-se para formas sexuadas, os gametócitos, que são responsáveis pela infecção do hospedeiro invertebrado, completando o ciclo. As espécies *P. vivax* e *P. ovale* possuem forma denominada hipnozoíta, que permanece dormiente nos hepatócitos, responsável pelo ressurgimento dos sintomas mesmo sem uma nova infecção.

O *P. falciparum* é responsável pelas formas mais graves da doença, conhecida como malária severa, que está associada com alta parasitemia, resposta inflamatória excessiva ao parasito da malária, e seqüestro de eritrócitos infectados em órgãos vitais (15, 16).

A existência da reprodução sexuada no ciclo do *Plasmodium* é uma das causas do surgimento da resistência aos tratamentos utilizados. O antimalárico cloroquina é o mais usado em tratamentos devido ao custo reduzido e poucos efeitos colaterais. Mas, já existem parasitas resistentes a ela na América do sul, Ásia e África (10). A proliferação da resistência aos antimaláricos atualmente utilizados está se tornando um grave problema de saúde pública. Essa proliferação se intensifica com o uso inadequado de novas drogas, ou seja, através da interrupção precoce do tratamento, causada por má orientação ao usuário.

Os estágios intraeritrocitários do *Plasmodium* são causadores da morbidez humana, daí o interesse por antimaláricos que atuem nestas fases, principalmente por vias metabólicas presentes no parasito que não são compartilhadas pelo homem. Duas delas, as vias MEP (2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato) e do chiquimato já foram descritas no *P. falciparum*, e acredita-se que tenham sido herdadas através do apicoplasto.

1.5 Apicoplasto

O *Plasmodium* é um protozoário que pertence ao grupo dos apicomplexos, os quais apresentam uma organela, denominada apicoplasto, e sugere-se que ela seja resultante de uma endossimbiose secundária, assim como cloroplasto de plantas. Uma alga fotossintetizante, possuindo um plastídio originado de uma endossimbiose primária teria sido englobado por um organismo não fotossintetizante, dando origem à uma endossimbiose secundária, o que justifica as várias membranas observadas nos apicoplastos, geralmente 3 ou 4. As duas membranas internas corresponderiam ao plastídio presente na alga englobada, a terceira membrana mais externa à membrana da alga, e a mais externa seria derivada do sistema endomembranar do hospedeiro. Em alguns casos teria ocorrido a perda de uma dessas membranas,

restando apenas 3. Ainda resta a discussão se essa alga seria um ancestral das algas vermelhas ou das verdes (17).

No curso da evolução o apicoplasto perdeu sua função fotossintética, mas parece ser importante na penetração do parasito na célula, demonstrado através da inibição da sua duplicação e observado que o parasito é capaz de crescer, se multiplicar, mas incapazes de invadir um outro hospedeiro durante o ciclo intraeritrocitário. A grande maioria dos genes foi translocada para o núcleo, restando apenas alguns genes residuais relacionados à sua auto-replicação (18).

O apicoplasto reteve algumas vias biossintéticas como a biossíntese de isoprenóides, de ácidos graxos e potencialmente do heme. As enzimas para essas vias são codificadas no núcleo, e apresentam peptídeos que sinalizam a sub-localização no apicoplasto e peptídeos de trânsito pelo sistema de membranas, localizados na porção N-terminal (18).

O *Plasmodium* apresenta características de células eucarióticas animais, e suas vias que não são compartilhadas com os animais, mas sim com bactérias e plantas são consideradas resultantes dessa endossimbiose que originou o apicoplasto, entre elas a via MEP e a via do Chiquimato. Assim, não é inesperado encontrarmos mais vias comumente observadas nos plastídios.

1.6 Via do metil eritritol fosfato (MEP)

O IPP (pirofosfato de isopentenila) e seu isômero DMAPP (pirofosfato de dimetilalila) são unidades isoprênicas básicas para biossíntese de isoprenóides, e que a via de biossíntese desses dois compostos depende do grupo estudado, os animais possuem a via do mevalonato, as bactérias usam a via 1-deoxi-D-xilulose 5-fosfato/2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato DOXP/MEP, e as plantas superiores possuem essa última via no plastídio e a do mevalonato no citoplasma. A identificação e caracterização do pirofosfato de farnesila (FPP) no *P. falciparum* (19), assim como a presença de dolicois (20), e proteínas covalentemente modificadas por isoprenóides (21) foram as primeiras evidências para o estudo da biossíntese de isoprenóides em *Plasmodium*. Jomaa *et al.* (22) caracterizaram dois genes essenciais da via MEP

(DOXP sintase e redutoisomerase) em *P. falciparum*, demonstrando que o parasita utiliza a via MEP para a biossíntese de isoprenóides.

Cassera *et al.* (23) descreveram os intermediários da via MEP em *P. falciparum*, além da biossíntese de novo da piridoxina 5'-P.

Os produtos secundários da via MEP que já foram caracterizados são:

- dolicois de 11 e 12 unidades isoprênicas (20)
- isoprenóides que se ligam às proteínas (21)
- ubiquinonas de 8 e 9 unidades isoprênicas (24)
- dolicois ligados às proteínas (25)

Em plantas, um dos produtos finais da via de isoprenóides são os terpenos, que possuem atividade bactericida (26, 27). Lopes *et al.* (28) inibiram a progressão de trofozoíto para esquizonte do *Plasmodium falciparum*, usando um óleo que identificaram conter Linalol e Nerolidol. Rodrigues Goulart *et al.* (29) demonstraram o efeito de quatro terpenos e um derivado sintético sobre o desenvolvimento *in vitro* do parasito, e também o efeito destes sobre a biossíntese de isoprenóides.

1.7 Via do Chiquimato

A via do Chiquimato tem como produtos finais os aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano, e como intermediário o Corismato. São sete passos até a formação do Corismato, iniciando com a condensação de fosfoenolpiruvato e eritrose 4-fosfato, e seus intermediários são pontos de ramificação para diversas vias. Além dos aminoácidos aromáticos, o Corismato pode dar origem a diversos outros compostos aromáticos, como tetraidrofolato, ubiquinonas, e vitaminas E e K (30).

A via do chiquimato, melhor estudada em algas, plantas superiores, bactérias e fungos, também está presente nos parasitos apicomplexos. Em *P. falciparum* a via foi descoberta como parte da biossíntese de folatos (31). Roberts *et al.* inibiram o crescimento *in vitro* de *Toxoplasma gondii*, *Plasmodium falciparum* e

Cryptosporidium parvum, utilizando o glifosato, que atua sobre a enzima 5-enolpiruvil-chiquimato-3- fosfato-sintase (EPSP sintase) da via do chiquimato (32). Em *T. gondii* e *P. falciparum*, e o efeito foi revertido pela adição do p-aminobenzoato (pABA), um dos intermediários da via do chiquimato na via de biossíntese de folatos (32).

O desenvolvimento do *P. falciparum* também foi inibido por ação de um RNA de interferência que atuaria sobre o RNA que codifica a corismato sintase, uma enzima da via do chiquimato (33). Análogos da via do chiquimato também produziram este efeito inibitório (34), e alguns deles atuaram em sinergia com o atovaquone, um antimalárico que atua sobre a via de transporte de elétrons no parasito (35).

As enzimas Chiquimato quinase, 3-deoxi-D-arabino-heptolusonato-7-fosfato-sintase (DAHP sintase), e chiquimato desidratase já foram descritas em *P. falciparum* (36). Em 2001 foi demonstrado através de ensaios de imunolocalização e confirmado por técnica de western blot que a Corismato sintase do *Plasmodium falciparum* está localizado no citosol (37).

Animais não possuem a via do chiquimato, e possuem somente a enzima dihidrofolato redutase dentre as enzimas das vias derivadas do corismato (38).

Como já mencionado acima, ubiquinonas, isoprenóides ligados às proteínas e dolicois ligados às proteínas são produtos da via de isoprenóides já identificados em *Plasmodium falciparum*. Outros produtos finais desta via também poderiam ser estudados neste organismo, tais como: vitaminas A, E e K, clorofila, carotenóides, giberelina, ácido abscísico, entre outros.

A presença das vias MEP e do Chiquimato no *Plasmodium falciparum* torna interessante o estudo da biossíntese de vitamina K no parasito da malária, e como esta vitamina não é biossintetizada por humanos, sua caracterização resultaria em um novo alvo de inibição e consequentemente desenvolvimento de antimaláricos.

Baseado na presença da via MEP, também foi estudada em nosso laboratório a via de biossíntese dos carotenóides, pela Dra. Renata Tonhosolo. Os carotenóides são formados através da condensação de duas moléculas de pirofosfato de

geranilgeranila (GGPP), e variadas reações subseqüentes que incluem ciclização, oxido-redução e isomerização. A biossíntese de alguns carotenóides já foi caracterizada (em fase de elaboração)¹. O produto da clivagem do β -caroteno é o retinal, precursor da vitamina A (Fig. 2). Além dos carotenóides e da vitamina A, o GGPP é precursor de muitos outros produtos, entre eles a vitamina K, as ubiquinonas.

Figura 2. Via de biossíntese de retinóides e vitamina K. Os retinóides (retinal, retinol e ácido retinóico) e as vitaminas K (filoquinona e menaquinona) são produtos finais da via dos isoprenóides. A formação das unidades isoprênicas pode ocorrer através da via do Mevalonato (animais) ou de ambas (bactérias e plantas). O anel aromático de ambas as formas de vitamina K é proveniente da via do Chiquimato. DMAPP (pirofosfato de dimetilalila), DOXP (1-deoxi-D-xilulose 5-fosfato), FPP (pirofosfato de farnesila), GAP (gliceraldeído-3-fosfato), GPP (pirofosfato de geranila), GGPP (pirofosfato de geranilgeranila), IPP (pirofosfato de isopentenila) e MEP (metil-eritritol-fosfato).

¹ Tonhosolo, R.; *et al.* São Paulo, 2008 (em fase de elaboração).

1.8 Produtos finais das vias MEP e/ou do chiquimato em estudo no *Plasmodium falciparum*

1.8.1 Vitaminas

As vitaminas são substâncias orgânicas que são fatores alimentares essenciais de alta atividade biológica e requerida em pequenas quantidades. São divididas em lipossolúveis e hidrossolúveis. As primeiras geralmente fazem parte da membrana celular, agindo de forma semelhante aos hormônios esteróides, e as hidrossolúveis são cofatores enzimáticos (39).

Entre as vitaminas lipossolúveis, as vitaminas A, E e K apresentam cadeia isoprênica em sua constituição, e as vitaminas E e K possuem anéis aromáticos originados da via do chiquimato.

1.8.1.1 Vitamina A

McCollum (40) descobriu que um fator necessário para o crescimento e desenvolvimento normais de animais poderia ser extraído de óleo vegetal. Esse fator foi nomeado “lipossolúvel A”, depois conhecida como vitamina A (41). Em 1930, Moore (42) demonstrou que um composto lipossolúvel de cor amarelada, e purificado como um carotenóide era transformado em uma forma ativa nos animais. Em seguida, Karrer *et al.* (43) caracterizaram, em 1931, a estrutura química do retinol e da pró-vitamina A (β -caroteno) (41, 43). Estudos posteriores mostraram que algumas funções da vitamina A eram na realidade produzidas por seus derivados, como retinal e ácido retinóico (41).

O retinal pode ser formado através da oxidação do retinol (44), além da clivagem do β -caroteno, tanto simétrica quanto assimétrica (45-48). O retinal é então oxidado a ácido retinóico pela retinal desidrogenase ou reduzido a retinol, através de uma via reversível catalisada pela retinol desidrogenase. Uma outra possibilidade de obtenção do ácido retinóico é a clivagem do β -caroteno sem o intermediário retinal (49).

A formação de retinóides a partir do β -caroteno é catalisada pelas caroteno-oxigenases, sendo que mamíferos possuem três enzimas dessa família: BCO I (β - β -caroteno oxigenase I) (50) que catalisa a clivagem simétrica do β -caroteno, e foi inicialmente identificada em *Drosophila melanogaster* (47, 48); A BCO II (β - β -caroteno-9'-10'-oxigenase) catalisa a clivagem assimétrica em animais formando retinal a partir do maior apocarotenal derivado da clivagem (46), e a proteína RPE65 (retinal pigment epithelium 65) foi proposta como a terceira enzima, mas provavelmente seja uma proteína que se liga ao retinol e ao *all-trans*-retinil-éster (51, 52). Além dos vertebrados, as carotenos oxigenases também estão presentes em fungos e cianobactérias (53-55).

O retinal tem função de cromóforo nos pigmentos visuais (56). A forma 11-*cis*-retinal é convertida sob estímulo luminoso ao *all-trans*-retinal, o que causa uma hiperpolarização da membrana plasmática (57). As rodopsinas também foram encontradas no grupo *Archae* e em algas (57, 58), e um homólogo foi descrito na cianobactéria *Nostoc sp.* (59).

Em cordados, o ácido retinóico é uma importante molécula sinalizadora, que atua no crescimento e na diferenciação celular através da ligação aos receptores nucleares (60, 61). Existem duas classes de receptores: RAR (retinoic acid receptor) e RXR (retinoic acid X receptor). A forma ácido-9-*cis*-retinóico é capaz de ligar às duas classes de receptores, enquanto a forma ácido-*trans*-retinóico liga-se somente ao RAR (62-64).

1.8.1.2 Vitamina K

A vitamina K, nos vertebrados, é importante por sua função de cofator da enzima que promove a γ -carboxilação de diversas proteínas, como por exemplo, os fatores envolvidos na coagulação. Henrik Dam ficou famoso pela descoberta desta vitamina e foi premiado com o Nobel de 1943. A descoberta ocorreu paralelamente por Almquist e Stockstad, que não foram agraciados com o prêmio ou com a lembrança da descoberta, pelas dificuldades em publicar causadas por interesses comerciais (65).

O termo vitamina K agrupa os compostos derivados de 2-metil-1,4-naftoquinonas que apresentam atividade de cofator na gama carboxilação de resíduos de glutamato. A estrutura básica é um anel naftoquinona, metilado na posição 2 e possui uma cadeia lateral situada na posição 3. O anel pode apresentar-se na forma oxidada ou ainda na forma reduzida, denominada hidroquinona. São, ainda, divididos em filoquinonas e menaquinonas. A filoquinona (2-metil-3-fetil-1,4-naftoquinona) é produzida por cianobactérias e plantas, e possui uma cadeia lateral de quatro unidades isoprênicas, sendo somente a primeira insaturada (Fig. 3A). Por outro lado, as denominadas menaquinonas (Fig. 3B) compõem um grupo de compostos produzidos por bactérias gram-positivas, e possuem a cadeia lateral com número variável de unidades isoprênicas (de 2 a 15 moléculas de IPP) completa ou parcialmente insaturada, na posição 3 do anel naftoquinona. As menaquinonas são abreviadas como MK-n ou K-n, sendo (n) o número de isoprenóides que compõem essa cadeia (39). Quando a cadeia lateral não está presente, a molécula recebe nome de menadiona, uma forma hidrossolúvel produzida comercialmente, e que quando absorvida por vertebrados é isoprenilada, geralmente a MK-4.

Figura 3. Estrutura dos homólogos de vitamina K. A: filoquinona, B: menaquinona. A filoquinona possui cadeia lateral com 4 unidades isoprênicas, e insaturação apenas na primeira unidade. Já a menaquinona possui cadeia lateral com número variável de unidades isoprênicas (n), todas com uma insaturação.

A vitamina K em cianobactérias é biossintetizada através da via do Chiquimato, com o corismato como intermediário. Seis reações enzimáticas subseqüentes conduzem à formação do anel naftoquinona, ou 1,4-diidroxi-2-naftoil-CoA. Este é

então isoprenilado por um pirofosfato de geranylgeranila e posteriormente metilado (66). Uma via similar é hipotetizada em plantas superiores (66, 67), mas neste caso a cadeia lateral isoprenóide é o fitol, também derivada do GGPP. Assim, a biossíntese das variadas formas desta vitamina são dependes da via de isoprenóides, seja do mevalonato ou DOXP/MEP.

Em plantas e cianobactérias a filoquinona participa na transferência de elétrons do fotosistema I (67). Já a menaquinona, presente em bactérias também atua na transferência de elétrons, mas na cadeia respiratória de bactérias anaeróbias, em alguns casos, atuam reduzindo o fumarato (68).

A vitamina K é importante na alimentação humana por sua ação como cofator da γ -carboxilação de resíduos glutamato, permitindo a formação de sítios de ligação de cálcio em diversos resíduos de proteínas, como nos intermediários da cascata coagulativa (protrombina, fatores II, VII, IX e X) (69), e de proteínas importantes para homeostase do cálcio nos ossos, como a osteocalcina, a proteína S e a proteína Gla da matriz (70). A ação de cofator na gama carboxilação é efetuada pelo núcleo, e assim tanto a menaquinona quanto a filoquinona apresentam esta atividade (71). A carboxilação de resíduos de glutamato leva à oxidação da vitamina K, que pode ser reduzida por ação da epóxi-redutase da vitamina K. Esta enzima sofre inibição por cumarínicos como a varfarina.

A forma de obtenção da vitamina K pelos animais é através da alimentação. Ela é absorvida pelo intestino delgado e sua eficiência é dependente da excreção de bile e secreção pancreática. A vitamina K é incorporada aos quilomícrons originados pelos enterócitos, e transportados pela via linfática para o fígado, e do fígado para outros tecidos através da circulação sanguínea, associado às lipoproteínas. A vitamina K não apresenta um transportador protéico específico, como ocorre para outras vitaminas lipossolúveis. No fígado predomina a forma filoquinona, enquanto nos tecidos extra-hepáticos há predominância da menaquinona-4. A cadeia lateral parece influenciar na porção do quilomícrom que permanece ligado, e este fator poderia influenciar na distribuição diferencial das formas de vitamina K (72).

2 OBJETIVOS

Devido à presença das vias MEP e do chiquimato no *Plasmodium falciparum*, resolvemos identificar a presença da biossíntese de vitamina K e de retinóides nos estágios intraeritrocitários do parasito.

A confirmação da presença de outros produtos derivados da via MEP (vitaminas A e K) enriqueceria o conhecimento sobre o metabolismo desse organismo, propiciando uma abordagem mais abrangente sobre novos e potenciais alvos para o desenho racional de drogas e/ou alternativas de combate e controle da malária.

3 METODOLOGIA

3.1 Cultura in vitro de *Plasmodium falciparum*

O isolado 3D7 de *P. falciparum* foi cultivada de acordo com Trager e Jensen (73). Foram montadas garrafas de cultivo 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 Albu-max I. Eritrócitos foram adicionados à cultura obtendo um hematócrito de 5%. As garrafas foram mantidas em estufa a 37 °C, com trocas diárias de meio e injeção de uma mistura gasosa composta por 5,05% CO₂, 4,93% O₂ e 90,2% N₂. O controle da parasitemia foi feito com a verificação microscópica diária de esfregaços corados com Giemsa.

3.2 Sincronização da cultura

As culturas foram sincronizadas em estágio trofozoíto jovem, utilizando sorbitol na proporção 1:25 (v/v pellet: sorbitol 5%), incubados a 37 °C durante 5 minutos e centrifugados a 800 x g por 10 minutos. Posteriormente, os parasitas, sincrônicos na fase anel, foram retornados ao cultivo normal (74).

3.3 Marcações metabólicas

Culturas de *P. falciparum* no estágio trofozoíto maduro (30 a 36 horas) com pelo menos 15% de parasitemia foram incubados com [1-(n)³H] pirofosfato de geranilgeranila (15 Ci/mmol, 0,75 µCi/ml) ou [1(n)-³H] pirofosfato de farnesila (15 Ci/mmol, 0,15 µCi/ml) por 12 a 16 horas. Eritrócitos não parasitados foram cultivados sob as mesmas condições como controle.

Após a marcação metabólica com cada precursor radioativo uma destas metodologias descritas a seguir foi utilizada para isolar parasitos dos eritrócitos para análise de vitamina A e K:

✓ Sistema de lise dos eritrócitos - Eritrócitos do cultivo de parasitos foram lisados com 0,1% (m/v) de saponina, e lavados duas vezes com tampão PBS (30

mM de Na_2HPO_4 , 6 mM de KH_2PO_4 , pH 7,4, 120 mM de NaCl e 11 mM de glicose). Eritrócitos do cultivo de controle foram lavados duas vezes com tampão PBS.

✓ Sistema sem lise de eritrócitos – Cultivos de parasitos e de eritrócitos não parasitados foram concentrados por centrifugação e lavados duas vezes com tampão PBS.

✓ Sistema de separação por gradiente – Os três estágios intraeritrocitários foram separados em um gradiente descontínuo de Percoll® 40/70/80% centrifugando a $10.000 \times g$ durante 30 min a 25 °C. Quatro bandas são formadas, a banda superior é constituída de parasitos mortos ou merozoítos que não invadiram os eritrócitos, a banda entre 40 e 70% possui eritrócitos parasitados com esquizontes, a banda entre 70 e 80% possui eritrócitos parasitados por trofozoítos maduros e no fundo do tubo os anéis e eritrócitos não parasitados. As bandas contendo as formas trofozoítos e esquizontes foram lavadas duas vezes com tampão PBS. A banda formada por eritrócitos infectados com a forma de anel foi separada por lise, como descrito acima. O cultivo de eritrócitos não parasitados (controle negativo) foi lavado duas vezes com tampão PBS, e as amostras armazenadas em nitrogênio líquido até a extração.

3.4 Método de obtenção de Coenzima Q_8

A coenzima Q_8 , utilizada para padronização de sistema de cromatografia por HPLC para análise de vitamina K, foi obtida de *Escherichia coli* (cepa NK40). O extrato de *E. coli* foi extraído com hexano: metanol (5: 2, v/v), agitado vigorosamente, e centrifugado a $500 \times g$ por 10 min. A fração de hexano foi coletada e evaporada sob fluxo de N_2 (75). O extrato foi ressuspenso em etanol e cromatografado em uma coluna C_{18} , sendo a fase móvel composta por metanol: hexano (75: 25, v/v) a um fluxo de 1 mL/min (75). As frações correspondentes ao tempo de retenção da coenzima Q_8 (9 min) foram monitoradas por luz UV (ajustada a 275 nm), coletadas e evaporadas sob corrente de nitrogênio, e armazenado a 20 °C negativos para uso subsequente.

3.5 Cromatografias das vitaminas A e K

O estudo da biossíntese das vitaminas A e K foi feito através de análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e cromatografia em camada delgada (TLC). Antes da separação por estas técnicas, os parasitos foram extraídos seguindo métodos específicos para cada vitamina, descritos mais adiante.

Materiais de HPLC e TLC, e orientações gerais para cromatografias

As análises por HPLC utilizando a coluna C₁₈, foram realizadas em um aparelho Gilson composto por uma bomba 322 com um modulador de gradiente acoplado, um regulador de temperatura 831, um coletor de frações FC203B, e um detector de UV 152 (Gilson Villiers-le-Bel, France). A análise foi feita utilizando o programa UNIPOINT™ (Gilson Inc.). Utilizamos uma coluna RP-HPLC Luna C₁₈ (250 x 4,6 mm, 5 µm, Phenomenex, CA, USA).

A cromatografia por HPLC utilizando a coluna YMC C30 (4,6 mm x 250 mm; 3 µm, YMC Inc., MA, USA) foi feita utilizando-se um aparelho HPLC-PDA equipado com uma bomba modelo 600 (Waters, Milford, USA), um degassificador, uma válvula de injeção Rheodyne com loop de 20 µL, e um aquecedor externo acoplado ao sistema de detecção 996 PDA (Waters, Milford, USA), ajustado para detectar a 450, 346 e 288 nm. A aquisição e o processamento dos dados foram feitos pelo software Millenium (Waters).

Todos solventes utilizados foram de gradiente nível HPLC, filtrados em membranas de PTFE Phenex Filter Membranes, 0,2 µm, 47 mm (Phenomenex CA, USA). As amostras antes de serem aplicadas também foram filtradas em filtros de nylon MFS 3, 200PK (Advantec MSF Inc, CA, USA).

Na cromatografia por HPLC de amostras radioativas, as frações foram coletadas a cada minuto, adicionadas de 500 µL de líquido de cintilação (Betaplate Scint, Perkin Elmer, Finland), agitadas no vortex por 10 s, e contadas num aparelho cintilador Beckman.

As cromatografias por TLC foram feitas utilizando-se cromatofolhas de sílica (Cromatofolhas Silicagel 60, 20 x 20 cm, Merck, Darmstadt, Germany) ou C₁₈

(Cromatofolhas 20 x 20 cm, RP-18F^{254s}, Merck, Darmstadt, Germany), com solventes de gradiente nível HPLC, em uma cuba de vidro com dimensões 10 x 30 x 26 cm. A cuba foi saturada com o solvente por 2h antes do início da cromatografia. No caso de estudo de compostos radioativamente marcados, as análises foram feitas utilizando filme autoradiográfico (Hyperfilm, Amersham, USA) que foi exposto à placa de TLC sensibilizada com EN³HANCE (Perkin Elmer, USA), por cerca de um mês; ou placa de detecção autoradiográfica Phosphor Screen (Storage Phosphor Screen, Tritium Screen, Amersham Biosciences) exposta à placa de TLC não sensibilizada por 7 a 14 dias.

Padrões das vitaminas estudadas foram misturados às amostras antes da purificação para identificar variações nos tempos de retenção ou nos R_f nas análises cromatográficas.

3.6 Cuidados no processamento das vitaminas

As vitaminas A e K atuam como anti-oxidantes por possuírem um alto poder redutor, e assim, oxidam-se facilmente. Alguns cuidados são necessários na manipulação durante as extrações e cromatografias. Os vidros foram previamente lavados com ácido nítrico, e cobertos com papel alumínio. Os solventes orgânicos foram evaporados sob N₂, e o material extraído foi armazenado a 20°C negativos, no escuro. Os trabalhos foram realizados em local com baixa luminosidade.

3.7 Vitamina A

3.7.1 Extração de vitamina A

Sistema I: clorofórmio e metanol - Para estudar a biossíntese da vitamina A, os concentrados de esquizontes lisados e de hemácias não parasitadas foram liofilizados e então extraídos, segundo a metodologia de Ito *et al.* (76). O produto liofilizado foi extraído duas vezes com clorofórmio: metanol (1:1, v/v), e duas vezes com metanol na proporção aproximada de 0,2 g/mL. Na primeira etapa da extração,

ao adicionar clorofórmio: metanol (1:1, v/v), as amostras também foram sonicadas por 10 minutos, e centrifugadas a 150 x g por 8 minutos. Nas outras etapas, foram agitadas por 10 s no vortex e então centrifugadas sob as mesmas condições. Os quatro sobrenadantes foram somados e secados sob pressão reduzida de N₂.

Sistema II: isopropanol, diclorometano e ácido acético glacial - Esquizontes obtidos por lise de eritrócitos e eritrócitos não parasitados, ambos liofilizados, foram extraídos com isopropanol: diclorometano: ácido acético glacial (40: 20: 1, v/v/v), o solvente foi adicionado com volume três vezes maior em relação à amostra (77). Essa mistura foi sonicada por 5 min, misturada em vortex por 30 s e centrifugada a 150 x g por 1 min. A extração é repetida, mas desta vez sem ser sonicada, apenas misturada no vortex e centrifugada da mesma maneira. O sobrenadante foi evaporado sob fluxo de N₂ para análise nos sistemas de cromatografias. A adição de ácido acético é importante para aumentar a recuperação do ácido retinóico (de 67% para 98%) (77).

Sistema III: extração em fase sólida (SPE) - Os retinóides foram extraídos por este sistema proposto por Schmidt *et al.* (78). Os extratos não liofilizados foram pesados e para cada 300 mg foi adicionada a mesma massa de água e homogeneizados. 400 µL desta mistura foram transferidos para tubos contendo 1,6 mL de isopropanol. A mistura foi agitada em vortex. As proteínas foram precipitadas por centrifugação (10.000 x g, 4 °C, 10 min), o sobrenadante foi transferido para outro tubo e adicionado 3,2 mL de clorofórmio. A mistura foi novamente agitada em vortex e centrifugada (3.000 x g, 4 °C, 10 min). A fase orgânica foi adicionada à coluna de NH₂ (coluna de SPE Strata NH₂, 55 µm 70Å, 500 mg/ 3 mL) pré-condicionada com 2 mL de hexano, que foi eluído a 6 mL/min. O fluxo foi alterado para 2 mL/min, e o eluído foi coletado. Nesta fração foram eluídos os retinóides apolares, tais como retinal e retinol. A coluna foi lavada com clorofórmio: isopropanol (2:1, v/v), ainda sob fluxo de 2 mL/min, e coletado no mesmo tubo. O ácido retinóico foi eluído da coluna utilizando clorofórmio: isopropanol (2:1, v/v) contendo ácido acético glacial em concentração final de 3%, sob fluxo de 2 mL/min e coletado em tubo separado.

3.7.2 Análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

Sistema I: acetonitrila e acetato de amônio - Frolik *et al.* (79) utilizou um sistema de cromatografia para analisar quatro retinóides (ácido retinóico, retinol, retinal e acetato de retinila), através de um sistema de HPLC de fase reversa (C₁₈) utilizando um sistema isocrático de acetonitrila: 1% acetato de amônio (4:1, v/v), com fluxo de 1,1 mL/min, em 35 min. Neste sistema os padrões foram monitorados a 350 nm.

Sistema II: análise de ácido retinóico - Este sistema de HPLC foi utilizado para analisar a biossíntese do ácido retinóico. A segunda fração obtida da coluna de NH₂ (sistema de extração III), correspondente aos retinóides polares, como o ácido retinóico, foi cromatografada por RP-HPLC em uma coluna C₁₈ eluída com acetonitrila: metanol: água: ácido acético (23: 7: 10: 0,2, v/v) a um fluxo de 1,5 mL/min, e o padrão foi monitorado a 350 nm. As 40 primeiras frações foram coletadas e após completamente secas foram adicionadas de 500 µL de líquido de cintilação para contagem de radioatividade (80).

3.7.3 Análises por cromatografia em camada delgada (TLC)

Sistema I: hexano e acetato de etila - Os três retinóides foram separados em placas de sílica utilizando-se uma mistura de hexano: acetato de etila (3:1, v/v), segundo proposto por Sani *et al.* (81).

Sistema II: hexano e acetona - Devery *et al.* (82) utilizaram uma placa de sílica gel e fase móvel hexano: acetona (97:3, v/v) para cromatografia por TLC para retinal, obtendo um R_f de 0,4.

Sistema III: fase reversa - Pyka e Sliwiok (83) propuseram um sistema de cromatografia por RP-TLC de vitamina E que também pode ser utilizada para vitamina A. A amostra extraída e seca é diluída em clorofórmio e aplicada em uma placa de fase reversa, C₁₈. Os compostos são eluídos com etanol 100%.

Sistema IV: TLC em 2 dimensões - A primeira fração obtida da coluna de NH₂ (sistema de extração III), correspondente aos retinóides apolares, foram cromatografados em placas de sílica impregnadas com tampão Tris-HCl 0,15 M, pH 8,0, em duas dimensões: na primeira dimensão com éter: hexano (1:1, v/v), e na

segunda dimensão com acetona: hexano (1:19, v/v) (84). Cada amostra foi aplicada em uma placa, e a análise dos compostos radioativamente marcados foi feita expondo uma placa de detecção autoradiográfica Phosphor Screen à TLC por 14 dias (84).

3.7.4 Cromatografia por HPLC e recromatografia em TLC

Parasitos e eritrócitos não parasitados liofilizados foram extraídos com soluções de clorofórmio: metanol (1:1, v/v) e metanol (sistema de extração I) as amostras foram eluídas do HPLC (C₁₈) com acetonitrila: 1% de acetato de amônio (sistema I). Padrões dos três retinóides foram co-cromatografados e monitorados por UV, e as frações correspondentes a estes padrões foram coletadas e o solvente de eluição foi evaporado sob pressão negativa de N₂ (fração de solvente orgânico) e liofilizado (para o solvente aquoso). Foram então ressuspensas em clorofórmio: metanol (1:1) e cromatografadas por TLC, sistema de TLC I (hexano: acetato de etila), e então expostas em um filme autoradiográfico por 1 mês.

3.7.5 Cromatografia por TLC e recromatografia em HPLC

Parasitos marcados metabolicamente com [³H]GGPP foram extraídos com isopropanol, diclorometano e ácido acético glacial (sistema de extração II). Após evaporação sob pressão negativa de N₂, a amostra foi ressuspensa em clorofórmio: metanol (1:1), e aplicada em placas para separação por cromatografia em camada delgada de fase reversa (sistema III de TLC). A banda correspondente ao padrão de vitamina A (*R_f* 0,68) foi recuperada da placa de TLC (com margem de erro de 0,5 cm) utilizando clorofórmio: metanol (1:1), secados sob N₂, ressuspensos na fase móvel do HPLC e analisados pelo sistema de HPLC (C₁₈) acetonitrila e acetato de amônio.

3.7.6 Espectrometria de massas por pulverização ionizante (ESI-MS)

As análises foram feitas em um aparelho “Finnigan LCQDuo ion trap mass spectrometer” (Finnigan, ThermoQuest Inc., San José, CA). Para análise do retinal as amostras foram ressuspensas em 30 µl de clorofórmio: metanol (1:1, v/v), contendo 2% de ácido fórmico, e para análise do ácido retinóico e retinol as amostras foram ressuspensas em metanol: água (1:1, v/v), com 2 mM de iodeto de lítio, e diretamente injetadas no ESI-Probe utilizando o sistema de pressão OMNIFIT, em um fluxo de 10 µL/min. Todos os espectros foram adquiridos em modo positivo e as condições de utilizadas são: voltagem do “spray” 4,52 kV, voltagem do capilar 17 V e temperatura do capilar 250 °C. Para as análises de ESI-MS/MS a energia de colisão relativa aplicada é de 40% (2 eV) e a pressão dos gases auxiliar (N₂) e de colisão (He) é de 1,5 mTorr e 4 psi respectivamente.

Para verificar a presença dos retinóides *no P. falciparum*, analisamos duas vezes os produtos de biossíntese do parasito por espectrometria de massas. Na primeira utilizamos 5 x 10¹² eritrócitos não parasitados, 1,07 x 10¹³ esquizontes e 1 mL de meio de cultura. As amostras foram extraídas com isopropanol: diclorometano: ácido acético glacial (sistema II de extração), cromatografadas em TLC de fase reversa (sistema III de TLC), a região correspondente ao R_f dos padrões de retinóides foi raspada, extraída com clorofórmio: metanol (1:1, v/v), secada sob fluxo de N₂ e recromatografada em HPLC (C₁₈) no sistema acetonitrila e acetato de amônio. As frações do HPLC correspondentes aos padrões, monitorados por UV, foram evaporadas sob fluxo de N₂ e liofilizadas para análise por espectrometria de massas.

Na segunda análise utilizamos aproximadamente 7,68 x 10¹² esquizontes, a mesma quantidade de eritrócitos não parasitados e 4 mL de meio de cultura liofilizado. Extraímos utilizando a coluna de NH₂ (sistema III de extração), e cromatografamos por HPLC em uma coluna C₁₈ e um sistema de solventes composto por acetonitrila e acetato de amônio (sistema I de HPLC). Somente a cromatografia dos padrões foi monitorada por UV. As frações eluídas da cromatografia de parasitos, eritrócitos não parasitados e meio de cultura

correspondentes aos tempos de retenção dos retinóides foram coletados, evaporados e analisados no espectrômetro de massas.

3.7.7 Espectrometria de massas Q-TOF

Utilizamos um aparelho de espectrometria de massas por tempo de voo (Q-TOF) para tentar detectar a presença de retinóides nos parasitos e nos eritrócitos não parasitados. Utilizamos cerca de $1,44 \times 10^{13}$ parasitas no estágio de esquizontes, e 5×10^{12} eritrócitos não parasitados. As amostras foram extraídas segundo o sistema III de extração (extração em fase sólida), e cromatografadas por HPLC. A primeira fração coletada da coluna de NH_2 , usada na extração, foi cromatografada no sistema de HPLC-sistema I, e a segunda fração foi cromatografada no sistema de HPLC-sistema II. Injeções em branco foram utilizadas para evitar contaminação. As amostras de eritrócitos não parasitados e esquizontes não foram monitorados por UV. Coletamos as frações correspondentes aos tempos de retenção dos padrões de retinóides, que foram evaporados sob fluxo de N_2 e por liofilização. Estas frações foram então analisadas no espectrômetro de massas por tempo de voo.

O aparelho utilizado pertence ao laboratório de espectrometria de massas localizado no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS, Campinas, SP) sob coordenação do Dr. Fábio César Gozzo. As amostras foram analisadas por injeção direta em solução 50% metanol contendo 2 mM de iodeto de lítio, usando um “Harvard Syringe pump model 11 e Micromass Q-TOF mass spectrometer”. As condições utilizadas foram: fluxo de 5 mL/min, temperatura de dissolvatação de 100 °C, temperatura do bloco de 100 °C, voltagem do capilar de 3000 V, voltagem do cone de 30 V. Os experimentos de MS foram realizados utilizando “TOF analyser” de 50 a 1000 m/z. No modo MS/MS, o íon foi selecionado no quadrupolo, seguido por uma colisão de argônio na célula de colisão do hexapolo com energia variando de 15 a 45 eV.

3.8 Vitamina K

3.8.1 Extração

Sistema I: isopropanol: hexano - Para análise da biossíntese de vitamina K, esquizontes e eritrócitos não parasitados marcados metabolicamente com [³H]GGPP foram extraídos de acordo com Sieradzan *et al.* (85). Assim, utilizamos 2 mL de isopropanol:hexano (1:1, v/v), a mistura foi sonicada por 10 min, misturada no vortex por 30 s e centrifugada a 150 x g por 2 min. As etapas de extração foram repetidas mais duas vezes, exceto a etapa no sonicador. A fase orgânica foi evaporada sob fluxo de N₂, para análise por cromatografia.

Sistema II: Extração sólido-líquido com coluna de sílica - O material obtido da cultura de parasitos por lise das hemácias parasitadas, sem lise ou separadas por gradiente de Percoll foi homogeneizado com 5 mL de isopropanol 66%, adicionou-se 6 mL de hexano, foi misturado por 5 min e centrifugado a 800 x g por 5 min. A fase orgânica foi evaporada e o concentrado ressuspenso em 2 mL de hexano, este foi aplicado em coluna de sílica (SPE Strata Si, 55 µm 70Å, 200 mg/ 3 mL) pré-condicionada com 5 mL de hexano: dietil-éter (96:4, v/v), e 5 mL de hexano 100%. A vitamina K é eluída da coluna utilizando 5 mL de hexano: dietil-éter (96:4; v/v) (86).

3.8.2 Análise da biossíntese de vitamina K por cromatografia em HPLC

Sistema I: coluna C₁₈, acetonitrila: diclorometano: metanol - Os extratos foram cromatografados em um sistema isocrático composto por acetonitrila: diclorometano: metanol (70: 20:10, v/v) em coluna C₁₈ a um fluxo de 1 mL/min. O monitoramento foi feito a 267 nm (87).

Sistema II: coluna C₁₈, metanol e etanol - Kamao *et al.* (88) propuseram um sistema de análise da vitamina K, utilizando uma coluna de fase reversa C₁₈, e um sistema isocrático composto por metanol: etanol (95:5, v/v). O resíduo obtido a partir da metodologia de extração de vitamina K foi redissolvido na fase móvel, e eluído sob um fluxo de 1 mL/min. Os padrões foram monitorados a 267 nm.

Sistema III: coluna C₃₀, gradiente trietilamina em metanol e MTBE - Parasitos marcados com [³H]GGPP foram separados por um gradiente descontínuo de Percoll,

e uma mistura das formas trofozoítos maduros e esquizontes (este último a forma predominante) foram extraídos segundo a metodologia de extração em coluna de sílica (sistema III). O mesmo foi repetido para eritrócitos não parasitados, e ambos foram cromatografados em um sistema de HPLC de fase reversa utilizando uma coluna C₃₀. Os extratos foram ressuspensos em 20 µL de metil *terc* – butil éter (MTBE), e analisados em uma coluna YMC C₃₀ (4,6 mm x 250 mm; 3 µm, YMC Inc., MA, USA). A eluição é feita através de um gradiente, o solvente A composto por 0,1 % de trietilamina (v/v) em metanol, e solvente B composto por 100% MTBE. Durante os primeiros 30 min, um gradiente linear foi aplicado de 95% para 75% de solvente A, e dos 30 aos 50 min, a porcentagem de solvente A foi reduzida linearmente para 50%, permanecendo nessas condições até o fim da corrida, aos 80 min. O fluxo aplicado foi de 1 mL/min e a coluna foi mantida a 30 °C (89). As frações foram coletadas a cada 1 min, e após evaporação completa do solvente foi adicionado líquido de cintilação para contagem da radioatividade. Essas análises cromatográficas foram realizadas no laboratório de alimentos da Professora e Dra. Adriana Mercadante, da UNICAMP, Campinas, SP.

Sistema IV: acetonitrila e isopropanol - As amostras foram cromatografadas segundo o sistema proposto por Sieradzan *et al.*, que consiste em um sistema de gradiente entre a fase móvel A (acetonitrila: isopropanol, 9:1, v/v) e B (acetonitrila: isopropanol, 1:9, v/v), cromatografados em coluna C₁₈ (85). Inicialmente 100% da fase móvel A é eluída, dos 13 min aos 17 min é aplicado um gradiente de 100% A para 100% B, e esta condição perdura até os 25 min. Então um gradiente é utilizado para reestabelecer a condição inicial da corrida, de 100% solvente A, durante 10 min. Mais 5 min são utilizados para equilíbrio das condições antes de iniciar uma nova cromatografia. O fluxo indicado no trabalho (2 mL/min) foi modificado para (1,5mL/min) reduzir a pressão interna à coluna.

3.8.3 Análise da biossíntese de vitamina K por cromatografia em TLC

Sistema I: NP-TLC - As amostras foram cromatografadas em placas de sílica com a fase móvel composta por éter de petróleo: clorofórmio (1: 4; v/v) (90).

Sistema II: RP-TLC - As amostras extraídas com acetona ou utilizando a coluna de Si, foram cromatografadas em placas de fase reversa C₁₈ utilizando-se a fase móvel composta por acetona: água (19: 1, v/v)(91).

3.8.4 Análise por cromatografia em HPLC e recromatografia em HPLC ou TLC

Para esta análise os eritrócitos parasitados não foram lisados (sistema sem lise de eritrócitos). Os concentrados obtidos da extração em fase sólido-líquida (sistema de extração II) foram cromatografados no sistema de HPLC metanol: etanol (sistema de HPLC I). As frações correspondentes a cada um dos padrões de vitamina K foram igualmente divididas em duas partes e evaporadas. Cada uma dessas partes foi recromatografada, uma delas em HPLC e outra em TLC.

O sistema de HPLC utilizado para recromatografia foi adaptado de Sieradzan *et al.* (85) As amostras foram ressuspensas em isopropanol e aplicadas em coluna de fase reversa, C₁₈ (sistema IV de HPLC). As frações foram coletadas para contagem radioativa após adição de 500 µL de líquido de cintilação.

A outra metade dos volumes eluídos da cromatografia por HPLC (metanol e etanol) foram recromatografadas em TLC com o eluente éter de petróleo: clorofórmio (sistema I de TLC). A radioatividade foi observada através de sensibilização da placa de detecção auto-radiográfica Phosphor Screen por 7 dias.

3.8.5 Espectrometria de massas por pulverização ionizante (ESI-MS)

O sistema e aparelho utilizados para análise de biossíntese de vitamina K por ESI-MS foram os mesmos indicados para espectrometria por ESI-MS para análise dos retinóides.

Utilizamos 2 mL (100 mL) de meio completo (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 Albu-max I), aproximadamente 5×10^{12} (5 mL, 25×10^{12}) eritrócitos não parasitados e $1,07 \times 10^{13}$ esquizontes obtidos

por lise dos eritrócitos. Eles foram extraídos segundo o sistema de extração sólido-líquido, e cromatografados por HPLC (C₁₈) no sistema de eluição com metanol e etanol. As frações correspondentes aos tempos de eluição dos padrões de menaquinona (MK-4) e filoquinona foram evaporadas e ressuspensas em clorofórmio: metanol (1:1, v/v) contendo 2 mM de iodeto de lítio para análise em espectrômetro de massas.

3.9 Testes de inibição

Os testes de inibição foram feitos em microplacas de 96 poços, utilizando 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 Albu-max I. Os testes iniciaram com parasitos no estágio de trofozoíto jovem, com parasitemia de 0,3% e 4% de hematócrito. A parasitemia e morfologia foram monitorados por esfregaços diários corados com Giemsa. As soluções estoque de cada droga foram preparadas semanalmente, e armazenadas a -20 °C. Quando a G-[³H]hipoxantina (5 µCi/mL) foi utilizada para monitorar crescimento dos parasitas, ela foi adicionada após 24 horas de cultura, e após mais 24 horas (às 48 horas de tratamento) foi retirado para medir a radioatividade. A IC₅₀ foi calculada pelo programa “Probit Analysis” (Minitab Statistical Software 13.30TM, Minitab Inc.)

3.9.1 Glifosato

Cálculo da IC₅₀ - O glifosato foi diretamente diluído em meio de cultura. As concentrações utilizadas para cálculo da IC₅₀ variaram de 0,01 a 10 mM. Utilizamos culturas sincrônicas, iniciando os tratamentos no estágio de anel, e parasitemia de 0,1 a 0,3 %. Os testes foram realizados em microplacas de 96 poços, por 96 horas e o crescimento foi acompanhado através de esfregaços a cada 24 horas por esfregaços corados com Giemsa. A IC₅₀ foi calculada para 48 horas.

O glifosato também foi testado em meio RPMI (Cultilab) 100% depletado de

ácido fólico e pABA.

Inibição da biossíntese de vitamina K com glifosato - Para verificar a interferência do glifosato na biossíntese de vitamina K, culturas com 5% de parasitemia foram tratados por 48 horas com o inibidor glifosato na concentração de 750 μM e, marcados metabolicamente nas últimas 16 h com [^3H]GGPP (15 Ci/mmol, 0,75 $\mu\text{Ci/ml}$). A biossíntese de vitamina K foi analisada através da cromatografia em coluna C_{18} (sistema III). Os parasitos foram isolados dos eritrócitos por gradiente de Percoll e extraídos em coluna sep-pak (sistema de extração II).

4 RESULTADOS

O estudo foi feito acompanhando-se a biossíntese dos isoprenóides nas formas intraeritrocitárias do *P. falciparum*, utilizando marcadores metabólicos que são precursores dos retinóides e da vitamina K.

As marcações metabólicas foram feitas por 16 horas entre as fases de trofozoíto maduro (30 a 36 horas) e esquizontes (48 horas). A partir dos esquizontes fizemos extrações específicas para cada vitamina, e analisamos através da contagem da radioatividade das frações separadas por HPLC ou através de filmes radiográficos obtidos da exposição das placas de TLC.

A padronização dos métodos para análise tanto dos retinóides quanto da vitamina K está separada no próximo tópico, assim como alguns resultados que não foram considerados relevantes para a conclusão do trabalho.

4.1 Vitamina A

4.1.1 Análise da biossíntese de retinóides por HPLC

No sistema I de RP-HPLC (fase móvel compostas por acetonitrila e acetato de amônio) os padrões apresentaram os seguintes tempos de retenção: 7-8 min para ácido retinóico, 17-18 min para retinol e 24-25 min para retinal. Nestas condições cromatografamos $1,2 \times 10^{12}$ parasitos metabolicamente marcados com precursores radioativos, que foram separados de eritrócitos não parasitados por lise com saponina, e então, extraídos com clorofórmio: metanol (1:1, v/v) e metanol (sistema I de extração). Das frações coletadas medimos a radioatividade e o resultado foi analisado através da figura 3.

Em geral, observamos contagem radioativa nas frações coletadas correspondentes às três formas de retinóides estudadas, mas os tempos de retenção dos padrões de ácido retinóico e de retinal localizam-se no fim de frações radioativas com contagem elevada em relação às frações de interesse (fração de injeção ou frações não identificadas), o que nos impede de identificar se a contagem radioativa corresponde a estes retinóides. Nos tempos de retenção do padrão retinol observamos fração radioativa deslocada, não coincidindo exatamente com o retinol.

Figura 4. Perfil radioativo (contagem por minuto-c.p.m.) da cromatografia por HPLC de produtos radioativamente marcados da biossíntese de esquizontes ($1,2 \times 10^{12}$) e eritrócitos não parasitados ($1,25 \times 10^{12}$). O precursor radioativo utilizado foi o [^3H]GGPP. As amostras foram extraídas com clorofórmio: metanol (1:1, v/v) e metanol e então cromatografadas em uma coluna C₁₈, com solvente isocrático acetonitrila: 1% acetato de amônio (4:1, v/v), com fluxo de 1,1 mL/min. Os tempos de retenção dos padrões estão indicados: RA (ácido retinóico), OL (retinol) e AL (retinal). As barras representam a quantidade de radioatividade medida para cada minuto coletado da cromatografia.

Padrões de GGPP, FPP, GOH, GGOH e FOH foram testados nesse sistema de HPLC, e as formas fosfatadas eluíram nas frações de injeção (3 a 4 minutos), enquanto o GOH eluiu aos 5 min, o FOH aos 9 min e o GGOH aos 22 min.

4.1.2 Análise da biossíntese de retinóides por cromatografia em TLC

Utilizamos dois sistemas de TLC de fase normal que separavam os três padrões de vitamina A, uma com sistema de solvente composta por hexano e acetato de etila (sistema I de TLC), e outra com hexano e acetona (sistema II de TLC).

3×10^{11} esquizontes metabolicamente marcados, separados dos eritrócitos não parasitados por lise com saponina, foram extraídos com clorofórmio e metanol (sistema de extração I) e cromatografados segundo o sistema I de TLC (hexano e acetato de etila), e obtivemos a imagem representada na figura 5A. Das quatro bandas observadas (R_f 0,93, 0,78, 0,42 e 0,40) apenas uma (R_f 0,93) tem o R_f próximo ao encontrado para um retinóide, mas não coincidente (retinal R_f 0,9).

No segundo sistema de TLC (hexano:acetona), cromatografamos $1,5 \times 10^{11}$ esquizontes radioativamente marcados, separados dos eritrócitos não parasitados através da lise com saponina, extraídos com clorofórmio e metanol (Fig. 5B). Observamos três bandas (R_f 0,25, 0,29 e 0,15) que não correspondem aos padrões de retinóides.

Figura 5: Auto-radiografias das cromatografias por duas metodologias de TLC dos produtos de eritrócitos não parasitados (E) e esquizontes (Pf) radioativamente marcados. Os R_f obtidos dos padrões estão indicados: AL (retinal), RA (ácido retinóico) e OL (retinol). Os R_f calculados das bandas estão à direita. **A:** aproximadamente 3×10^{11} esquizontes e 5×10^{11} eritrócitos não parasitados foram extraídos com clorofórmio e metanol. A cromatografia foi realizada com hexano: acetato de etila (3:1, v/v) em placas de sílica (sistema de TLC I). **B:** $2,5 \times 10^{11}$ eritrócitos não parasitados e $1,5 \times 10^{11}$ esquizontes, extraídos com clorofórmio e metanol e cromatografados em placa de sílica, utilizando-se a fase móvel hexano: acetona (97:3, v/v).

Para tentar identificar as bandas observadas nessas auto-radiografias, cromatografamos alguns produtos e intermediários da via dos isoprenóides, que poderiam ser biossintetizados a partir do [^3H]GGPP. Os valores dos R_f encontrados estão na tabela 2. Com relação à figura 5A (hexano: acetato de etila), as bandas com R_f iguais a 0,78 e 0,40, observadas na auto-radiografia de amostras extraídas de esquizontes, têm R_f coincidente com os padrões de farnesol e pirofosfato de geranilgeranila, respectivamente.

Quando cromatografamos esses padrões pelo segundo sistema de TLC (hexano e acetona), verificamos que o R_f do farnesol era coincidente com o do retinol, tornando a metodologia pouco interessante no caso do estudo da biossíntese do retinol. Mas, como já dito, nenhuma banda foi observada com R_f correspondente aos padrões de retinóides. As três bandas observadas na auto-radiografia (R_f 0,15, 0,25 e 0,29) não foram identificadas.

Tabela 1. Valores de R_f de diversos intermediários e produtos da via de isoprenóides em duas metodologias de cromatografias por TLC para análise da biossíntese de retinóides. Foram utilizadas placas de sílica e as fases móveis estão indicadas. Alguns destes padrões não foram cromatografados através da segunda metodologia (-).

Fase móvel Padrões	Hexano: Acetato de etila (3:1, v/v)	Hexano: Acetona (97: 3, v/v)
	R_f	R_f
β -caroteno	1,0	-
α -caroteno	1,0	-
9- <i>cis</i> -retinal	0,89	0,5
<i>all-trans</i> -retinal	0,88	0,5
GGOH	0,85	0,03
FOH	0,78	0,07
13- <i>cis</i> -ácido retinóico	0,72	0,03
<i>all-trans</i> -ácido retinóico	0,72	0,03
9- <i>cis</i> -ácido retinóico	0,71	0,03
GOH	0,72	0,07
FPP	0,64	0,04
13- <i>cis</i> -retinol	0,59	0,06
<i>all-trans</i> -retinol	0,59	0,05
GGPP	0,39	0,04
Licopeno	0	-
Luteína	0	-

4.1.3 Extração em fase sólida, TLC 2D e HPLC para análise do ácido retinóico

Na metodologia de TLC de duas dimensões o ácido retinóico e o retinol apresentaram R_f muito próximos ao do GOH. Os R_f encontrados para os padrões foram os seguintes (1ª dimensão x 2ª dimensão): retinal (0,49 x 0,88); retinol (0,16 x 0,41); ácido retinóico (0,09 x 0,5); GOH (0,12 x 0,39); GGOH (0,04 x 0,48); FOH (0,24 x 0,49).

Como o sistema de separação em coluna de NH_2 (sistema de extração III) separa o ácido retinóico dos dois outros retinóides, a primeira fase eluída da coluna (fração de eluição dos retinóides apolares - retinal e retinol) foi cromatografada no sistema de TLC de duas dimensões, enquanto a segunda fase (fração de eluição dos retinóides polares - ácido retinóico) foi cromatografada em HPLC, e descrito mais adiante.

Para analisar por este sistema, utilizamos $1,6 \times 10^{12}$ esquizontes isolados através da lise dos eritrócitos com saponina e $1,6 \times 10^{12}$ eritrócitos não parasitados, metabolicamente marcados com $[^3\text{H}]\text{GGPP}$. Na imagem obtida após 14 dias de exposição da placa de detecção auto-radiográfica Phosphor screen à placa de TLC dos esquizontes (Fig. 6) observamos quatro bandas, mas nenhuma delas apresenta R_f coincidente com os padrões de retinal e retinol. Uma delas tem o R_f do geraniol (GGOH). Na imagem obtida da cromatografia de eritrócitos não parasitados nenhuma banda foi visualizada (não mostrado).

Figura 6. TLC de duas dimensões. $1,6 \times 10^{12}$ esquizontes radioativamente marcados foram extraídos utilizando a coluna de NH_2 , a primeira fração foi cromatografada neste sistema de duas dimensões, a primeira eluída com éter: hexano (1: 1, v/v), e a segunda com acetona: hexano (1: 19, v/v). A imagem foi obtida expondo uma placa de detecção auto-radiográfica Phosphor screen à TLC foi após 14 dias. Os R_f dos padrões de retinal (AL), retinol (OL), geraniol (GOH), farnesol (FOH) e geranilgeraniol (GGOH) estão destacados em branco. As linhas pontilhadas indicam o R_f de 0,5.

Após separação das frações em coluna de NH_2 , a fração correspondente ao ácido retinóico foi evaporada e cromatografada por um sistema de HPLC próprio para ácido retinóico, em coluna de fase reversa C_{18} , e fase móvel composta por acetonitrila, metanol, água e ácido acético. Após contagem da radioatividade dos tubos coletados não foi registrado nenhum aumento significativo nas frações correspondentes ao tempo de retenção do ácido retinóico (Fig. 7).

Figura 7. Perfil radioativo de parasitos e eritrócitos não parasitados cromatografados no sistema de HPLC para análise de ácido retinóico. $1,6 \times 10^{12}$ esquizontes e $1,6 \times 10^{12}$ eritrócitos não parasitados, metabolicamente marcados com $[^3\text{H}]\text{GGPP}$ foram extraídos em coluna de NH_2 (sistema III de extração) e analisados em coluna C_{18} , fase móvel composta por acetonitrila: metanol: água: ácido acético (23: 7: 10: 0,2, v/v) a um fluxo de 1,5 mL/min.

4.1.4 Espectrometria de massas Q-TOF

Analizamos no espectrômetro de massas por tempo de voo $1,44 \times 10^{13}$ parasitos no estágio de esquizontes (isolados dos eritrócitos por lise destes com saponina) e eritrócitos não parasitados (5×10^{12}), extraídos segundo o sistema de extração em fase sólida (sistema III). A primeira fração eluída da coluna de extração, que contém os retinóides mais apolares, foi cromatografada em coluna C_{18} , com solvente composto por acetonitrila e acetato de amônio (sistema I de HPLC). Na segunda fração eluída da coluna de extração, são eluídos os retinóides mais polares, como o ácido retinóico. Esta fração foi então cromatografada em um sistema de cromatografia próprio para o ácido retinóico (sistema II de HPLC).

As frações coletadas das cromatografias foram analisadas no espectrômetro de massas após serem evaporadas sob fluxo de N₂. Procuramos pelos íons mais abundantes observados nos padrões de retinol, retinal e ácido retinóico, incluindo as formas *13-cis*, *9-cis* e *all-trans* de todos os três padrões. Não observamos nenhum destes íons nas frações provenientes da cromatografia de parasitos (não mostrado).

4.2 Vitamina K

Assim como no estudo que visava verificar a biossíntese de retinóides no *P. falciparum*, utilizamos para a investigação da ocorrência da biossíntese de vitamina K a análise dos produtos radioativamente marcados através de autoradiografias da TLC ou medição da radioatividade das frações coletadas do HPLC em um beta-contador, ou então análise de produtos não marcados através de espectrometria de massas.

4.2.1 Análise da biossíntese de vitamina K por HPLC

Sistema II

Cromatografamos segundo o sistema II de HPLC para vitamina K (metanol: etanol, C₁₈) 1,0 x 10¹² esquizontes e 8 x 10¹² eritrócitos não parasitados metabolicamente marcados com [³H]GGPP. Os esquizontes foram isolados dos eritrócitos por lise com saponina e foram extraídos segundo o sistema de extração em fase sólida. O BHT (2,6-Di-*tert*-butil-4-metilfenol) foi adicionado para evitar oxidação dos compostos durante a extração e a cromatografia. O perfil radioativo obtido apresenta aumento da contagem nas frações com tempo de retenção iguais ao do padrão de menaquinona (Fig. 8). Nesse sistema de análise foram cromatografados também padrões de produtos ou intermediários da via de isoprenóides, que também poderiam estar radioativamente marcados quando o [³H]GGPP é usado como precursor metabólico. Entretanto, nenhum padrão de produto ou intermediário da via apresentou tempo de retenção que pudesse interferir

na análise da biossíntese da vitamina K: ubiquinonas Q6 (14 min), Q8 (17-18min), Q9 (47-49 min) e Q10 (76-77 min), além do GOH (3-4 min), FOH (3-4 min), GGOH (5 min), prenóis de 10, 11 e 12 unidades isoprênicas (todos aos 4 min), GGPP (3-4 min) e FPP (3-4 min).

Figura 8. Perfil radioativo da cromatografia por HPLC (sistema II). 1×10^{12} esquizontes e 8×10^{12} eritrócitos metabolicamente marcados com $[^3\text{H}]\text{GGPP}$ foram extraídos segundo o sistema de extração sólido-líquido (sistema de extração II), e cromatografados em HPLC, utilizando coluna C_{18} , e fase móvel composta por metanol: etanol (95: 5, v/v). Os tempos de retenção dos padrões de vitamina K estão indicados pelas setas.

Repetimos a metodologia, alterando apenas a forma de isolar os esquizontes dos eritrócitos não parasitados, que foi feita através do gradiente de Percoll, e não por lise dos eritrócitos. Utilizamos uma quantidade de esquizontes próxima ao que foi utilizado na cromatografia anterior, e o perfil obtido foi o mesmo, apenas com maiores valores de c.p.m. nas frações de injeção. A quantidade de c.p.m. detectada nas frações correspondentes ao padrão de menaquinona também foi semelhante.

Sistema III (coluna C₃₀)

1,28 x 10¹² esquizontes metabolicamente marcados com [³H]GGPP foram separados por gradiente descontínuo de Percoll. Os esquizontes e os eritrócitos não parasitados (2 x 10¹²) foram extraídos com coluna de sílica (sistema II de extração). As amostras foram cromatografadas em uma coluna de HPLC de fase reversa C₃₀. O BHT (2,6-Di-*tert*-butil-4-metilfenol) foi adicionado para evitar oxidação dos compostos durante a extração e a cromatografia.

No perfil radioativo observamos frações radioativas com tempo de retenção correspondente ao obtido para a filoquinona, que é a forma de vitamina K produzida por plantas. Não foi registrada fração radioativa no tempo de retenção correspondente ao padrão de menaquinona (Fig. 9).

Figura 9. Perfil radioativo da cromatografia em coluna C₃₀. Foram usados 2 x 10¹² eritrócitos não parasitados e 1,28 x 10¹² de parasitos metabolicamente marcados com [³H]GGPP. Os parasitos foram isolados por centrifugação em gradiente descontínuo de Percoll. A extração da vitamina K foi feita através do sistema de extração sólido-líquido, e as amostras contendo padrões de vitamina K (MK-4 e PK) e antioxidante (BHT) foram cromatografadas por HPLC em coluna C₃₀. Os tempos de retenção das duas formas de vitamina K monitoradas por UV estão indicadas. A fração aos 11 min teve contagem de 35.000 c.p.m., que foi reduzido para facilitar observação.

Diversos padrões de produtos isoprênicos formados a partir do GGPP foram cromatografados nesse sistema e nenhum deles apresentou o tempo de retenção da filloquinona (Tabela 2).

Tabela 2. Tempo de retenção de padrões cromatografados em HPLC, coluna C₃₀ (sistema II de HPLC).

Padrão	Tempo de retenção (min)
Fitol	< 5
GGPP	< 5
FPP	< 5
GOH	< 5
FOH	< 5
GGOH	< 5
Prenol 7	7,27
Prenol 8	7,36
Prenol 9	9,50
Prenol 10	16,12
Prenol 11	19,76
Dolicol 11	19,89
Prenol 12	23,65
Prenol 14	23,38
Q10	25,90
Prenol 15	27,05
Q9	29,80
Prenol 16	30,77
Prenol 17	36,84
Prenol 18	39,69
Prenol 19	42,24
Prenol 20	46,66
Prenol 21	48,57
Prenol 22	50,29

Quando repetimos a metodologia, modificando apenas a quantidade de parasitos, observamos modificações importantes no perfil. Nesta segunda cromatografia, a quantidade de esquizontes foi de aproximadamente 2×10^{12} , e observamos no perfil radioativo frações radioativas correspondentes aos tempos de retenção dos dois padrões de vitamina K. Essas frações são semelhantes com relação à quantidade de c.p.m. medida (Fig. 10).

Figura 10. Perfil radioativo da cromatografia de 2×10^{12} esquizontes em coluna C_{30} . Os esquizontes e 2×10^{12} eritrócitos não parasitados foram metabolicamente marcados com $[^3H]GGPP$. Os parasitos foram separados por gradiente de Percoll, e extraídos em coluna de sílica (extração sólido-líquido) antes de serem cromatografados. Foi utilizado o BHT para prevenir a oxidação. A fração de injeção (4-5 min) foi superior a 10 mil com, mas a escala foi reduzida para melhor observação das frações de interesse.

4.2.2 Espectrometria de massas

Cerca de $6,58 \times 10^{12}$ parasitos no estágio de esquizonte, isolados por lise das hemácias com saponina, foram extraídos em uma coluna de sílica (sistema II de extração), e cromatografados em HPLC utilizando a coluna C_{18} (sistema II de HPLC).

As frações correspondentes à menaquinona-4 e à filoquinona foram evaporadas e analisadas no espectrômetro de massas. $2,5 \times 10^{13}$ eritrócitos não parasitados e 100 mL de meio de cultura também foram extraídos e cromatografados para serem analisados.

As frações coletadas do HPLC foram diluídas em clorofórmio: metanol (1: 1, v/v) adicionadas de 2 mM de iodeto de lítio para análise no espectrômetro. Nos espectros obtidos dos padrões de menaquinona-4 e filoquinona observamos como íon mais abundante o $451,5 \text{ m/z}^+$ e o $457,6 \text{ m/z}^+$, respectivamente. Esses valores correspondem às massas de cada molécula adicionados de 7 unidades, a massa do lítio. O íon $451,5 \text{ m/z}^+$ foi observado nas frações coletadas da cromatografia de eritrócitos não parasitados, meio de cultura e de esquizontes. As quebras deste íon, das três amostras, apresentaram perfis semelhantes ao obtido na quebra do íon $451,5 \text{ m/z}^+$ do padrão de menaquinona- 4 (Fig. 11). O mesmo ocorreu para o íon $457,6 \text{ m/z}^+$ correspondente à filoquinona que foi observado nos perfis de esquizontes, de meio de cultura e de eritrócitos não parasitados, com perfis de quebra do íon $457,6 \text{ m/z}^+$ contendo os mesmos íons principais (Fig. 12).

Figura 11: Espectros de massas das frações correspondentes à menaquinona-4. Cerca de $6,58 \times 10^{12}$ esquizontes, $2,5 \times 10^{13}$ eritrócitos não parasitados e 100 mL de meio de cultura foram extraídos (sistema I) e cromatografados por HPLC (sistema II). As frações correspondentes à menaquinona foram analisadas no espectrômetro de massas (Ion Trap), e comparadas ao padrão. À esquerda estão representados os espectros do íon molecular ($451,5 \text{ m/z}^+$), e à esquerda os perfis de quebra deste íon. O perfil de quebra do íon molecular do padrão não foi monitorado na mesma extensão que as amostras analisadas.

Figura 12. Espectros de massas das frações correspondentes à filoquinona. Cerca de $6,58 \times 10^{12}$ esquizontes, $2,5 \times 10^{13}$ eritrócitos não parasitados e 100 mL de meio de cultura foram extraídos (sistema II) e cromatografados por HPLC (sistema II). As frações correspondentes à menaquinona foram analisadas no espectrômetro de massas (Ion Trap), e comparadas ao padrão. À esquerda estão representados os espectros do íon molecular ($457,5 \text{ m/z}^+$), e à esquerda os perfis de quebra deste íon. O perfil de quebra do íon molecular do padrão não foi monitorado na mesma extensão que as amostras analisadas.

4.2.4 Glifosato não inibe biossíntese de vitamina K

Testamos cinco concentrações de glifosato em culturas *in vitro* dos estágios intraeritrocitários de *P. falciparum*, iniciando os testes no estágio anel, e tratando por 96h. Monitoramos diariamente através de esfregaços sanguíneos, e utilizamos os resultados de 48h para calcular a IC₅₀. Observamos que altas concentrações de glifosato (acima de 5 mM) apresentaram valores mais baixos de pH que poderiam interferir nos resultados. Tentamos corrigir essa variação ajustando com bicarbonato de sódio. Encontramos uma IC₅₀ para 48 h de 0,96 mM (Fig. 13).

Figura 13. Gráfico de inibição do crescimento *in vitro* de *P. falciparum* pelo glifosato. O gráfico representa a porcentagem de inibição do tratamento por 48 horas.

Utilizamos um valor próximo ao da IC₅₀ obtida para 48 horas para testar a ação do glifosato sobre o perfil obtido da cromatografia em coluna C₁₈. Pretendíamos verificar se ocorria alguma variação nas frações radioativas com tempo de retenção correspondente ao da menaquinona. Culturas sincrônicas em anel foram tratadas com 750µM de glifosato por 48h e marcadas com [³H]GGPP nas últimas 16 horas, e os esquizontes extraídos (sistema II) e cromatografados em coluna C₁₈ (sistema II), repetindo a metodologia já citada. Não observamos nenhuma redução da detecção das frações radioativas correspondentes à menaquinona do grupo tratado (11 min) em relação ao grupo controle (Fig. 14). Houve um deslocamento das frações

radioativas à direita, coincidindo com o aumento em um minuto dos os tempos dos padrões de vitamina K.

Figura 14. Inibição do glifosato. Parasitos foram inibidos por 48h com 750µM de glifosato. Foram extraídos em coluna de sílica (sistema II) e cromatografados em coluna C₁₈ para acompanhamento da biossíntese de vitamina K. A marcação metabólica foi feita com [³H]GGPP, e cada grupo continha cerca de 7,5 x 10¹¹ parasitos.

4.3 Padronização da metodologia

4.3.1 Vitamina A

4.3.1.1 Padronização dos métodos de HPLC para vitamina A

Na busca de metodologia de cromatografia adequada para retinóides, testamos cinco sistemas de HPLC utilizando padrões de 13-*cis*-retinal, *all-trans*-ácido retinóico e *all-trans*-retinol, buscando por sistemas nos quais os padrões não eluíssem na fração de injeção e, ao mesmo tempo, que fossem capazes de separar as três formas de retinóides estudadas. Dessa forma foram desconsiderados para análise da biossíntese de retinóides no parasito os sistemas de McCormick *et al.*, Barua *et al.*, Napoli e Schmidt *et al.* (92-94), por não serem adequadas às

expectativas descritas. Os tempos de retenção que obtivemos não coincidem com os citados pelos autores nos trabalhos, essas diferenças, e prováveis razões também estão listadas na tabela 1, assim como as condições de cromatografia utilizadas.

As condições cromatográficas que utilizamos no trabalho foram as de Frolik (79) e Urbach (80). O sistema de Frolik foi utilizado para análise da ocorrência de biossíntese dos três retinóides, enquanto o sistema de Urbach somente para a biossíntese de ácido retinóico, já que por este sistema o retinal e o geranilgeraniol co-eluíam. Os tempos de retenção encontrados para outros padrões para o sistema de Urbach foram: GOH (4 min), FOH (11-12 min), OL (32 min), RA (35 min), e AL e GGOH (41-42 min). Os tempos de retenção destes padrões na metodologia de Frolik já foram comentados na seção 4.1.1.

Tabela 3: Resumo das metodologias que foram descartadas nos nossos estudos porque o tempo de retenção dos retinóides era próximo à fração de injeção, ou porque dois ou mais retinóides co-eluíam. 13cRA: 13-cis-ácido retinóico; 9cRa: 9-cis-ácido retinóico; atRA: all-trans-ácido retinóico.

Autores e coluna utilizada	Sistema de solventes	Retinóides (tempos de retenção)		Possíveis razões para diferença dos cromatogramas
		Obtido pelos autores	Obtidos por nós	
McCormick <i>et al.</i> (92). C ₁₈ , 4,6 x 300 mm; 10 µm.	Metanol: água (4:1, v/v) + 10 mM acetato de amônio. Fluxo não citado pelos autores	Ácido retinóico (11 mL) Retinal (22 mL) Retinol (26 mL)	Ácido retinóico (15,4 mL) Retinal e Retinol (38 mL)	Utilizamos coluna mais curta e com partículas menores (250 x 4,6 mm i.d, 5 µm). Utilizamos fluxo de 1,1 mL.
Barua e Olson (93). C ₁₈ , 100 x 4,6 mm; 3 µm.	A: Metanol: água (3:1, v/v) + 10 mM acetato de amônio B: Metanol: diclorometano (4:1, v/v) Gradiente linear de 100% A para 100% B por 15-20 min. Fluxo 0,8 mL/min.	Ácido retinóico (11 min) Retinol (12,9 min) Retinal (13,8 min)	Ácido retinóico (16 min) Retinal (20 min) Retinol (21 min)	Utilizamos coluna mais comprida e com partículas maiores (250 x 4,6 mm i.d, 5 µm).
Napoli (94) C ₁₈ , 0,62 x 8 cm; 3 µm	Acetonitrila: água (1:4, v/v) Fluxo 2 mL/min	Retinol (18 mL) Retinal (25 mL)	Retinal (3 min)	Utilizamos coluna com diâmetro interno menor, mais comprida e com partículas maiores (250 x 4,6 mm i.d, 5 µm).
Schmidt <i>et al.</i> (78) C ₁₈ , 2,1 x 150 mm; 3 µm.	A: 60 mM acetato de amônio: metanol 91:1, v/v), pH 5,7 ajustado com ácido acético B: metanol 21 min 80% solvente A; 21- 25 min gradiente linear de 80% para 0% solvente A; 25- 27,5 min 100% solvente B; 27,5 min gradiente linear de 0% para 80% solvente A. Fluxo: 0,25 mL/min.	Ácido retinóico (17 min)	Ácido retinóico (25 min) Retinal (27 min) Retinol (27 min)	A coluna que utilizamos apresenta maiores dimensões e partículas internas maiores.

4.3.1.2 Padronização de método para TLC de vitamina A

Quatro metodologias de TLC foram utilizadas para os ensaios em que se buscava identificar retinóides no parasito. Quando testamos os padrões no sistema de Devery e Milborrow (82) (sistema II de TLC), o R_f encontrado para o retinal foi bastante semelhante ao citado pelos autores, porém, o retinol e o ácido retinóico não foram analisados pelos autores.

4.3.1.3 Padronização da quantidade de parasitos

Comparamos os resultados na cromatografia por HPLC modificando a quantidade de parasitos. Cromatografamos três quantidades diferentes de esquizontes metabolicamente marcados com [^3H]GGPP: 3×10^{11} , 6×10^{11} e $1,2 \times 10^{12}$. Os esquizontes foram extraídos com clorofórmio e metanol (sistema I de extração), e cromatografados em coluna C_{18} eluídos com mistura de acetonitrila e acetato de amônio (sistema I de HPLC). A quantidade 3×10^{11} de parasitos marcados com [^3H]GGPP não resultou em quantidade suficiente para análise de retinóides por HPLC (não mostrado), pois o perfil radioativo apresentou valores basais em toda a cromatografia, e nenhuma fração radioativa de interesse foi observada.

Os perfis da cromatografia 6×10^{11} (Fig. 15A) e $1,2 \times 10^{12}$ parasitos (Fig. 15B) pela técnica de HPLC, foram semelhantes, com o aumento já esperado nos c.p.m. da cromatografia de $1,2 \times 10^{12}$ parasitos. Ainda nesta segunda cromatografia observamos frações radioativas coincidentes com o tempo de retenção do retinol, mas as outras análises não confirmaram sua biossíntese.

Figura 15. Perfil radioativo (contagem por minuto-c.p.m.) da cromatografia por HPLC de produtos radioativamente marcados da biossíntese de esquizontes (6×10^{11} em **A** e $1,2 \times 10^{12}$ em **B**) e eritrócitos não parasitados ($1,25 \times 10^{12}$ em cada). O precursor radioativo utilizado foi o $[^3\text{H}]\text{GGPP}$. As amostras foram extraídas com clorofórmio: metanol (1:1, v/v) e metanol e então cromatografadas em uma coluna C_{18} , com solvente isocrático acetonitrila: 1% acetato de amônio (4:1, v/v), com fluxo de 1,1 mL/min. Os tempos de retenção dos padrões estão delimitados: RA (ácido retinóico), OL (retinol) e AL (retinal). O perfil **A** é o mesmo mostrado na figura 4, colocado aqui apenas para facilitar a comparação.

4.3.1.4 Espectrometria de massas

Com o intuito de verificar se as frações radioativas observadas na cromatografia por HPLC correspondiam aos retinóides, recorreremos à análise por espectrometria de massas. Previamente à análise no Q-TOF, tentamos analisar por duas vezes no ESI-MS, modificando a metodologia:

A - $1,07 \times 10^{13}$ esquizontes foram extraídos segundo o sistema II (isopropanol: diclorometano: ácido acético glacial) de extração, cromatografados em TLC de fase reversa (sistema III) e a banda de R_f correspondente aos retinóides foi raspada e cromatografada no HPLC para maior limpeza da amostra. As frações com tempos de retenção coincidente com os dos retinóides foram coletadas após separação por HPLC e analisadas em um ESI-MS. Utilizamos para como controle 5×10^{12} eritrócitos não parasitados e 1 mL de meio de cultura.

B - $7,68 \times 10^{12}$ esquizontes, a mesma quantidade de eritrócitos não parasitados e 4 mL de meio de cultura liofilizado. Antes de analisar no espectrômetro, eles foram extraídos através da metodologia de extração em fase sólida (sistema III) e cromatografados no sistema de HPLC segundo o sistema I de HPLC (coluna C_{18} , solvente: acetonitrila: acetato de amônio).

Nos perfis da figura 16 o íon correspondente ao retinol (269 m/z^+) foi observado com baixa intensidade em parasitas. Este íon não foi observado em hemácias não infectadas ou no meio RPMI.

No caso da análise por espectrometria de massas do padrão ácido retinóico o íon mais abundante foi o 301 m/z^+ . Nas amostras analisadas (hemácias não infectadas, meio RPMI e esquizontes) a abundância deste íon foi correspondente ao ruído.

Os íons que caracterizam o retinal e o retinol foram visualizados no perfil de parasitos com intensidades muito baixas, que poderia ser interpretado como ruído. Mas não confiamos que a sensibilidade do método tenha sido suficiente para compensar possíveis perdas por degradação durante os procedimentos, principalmente por terem passado por dois sistemas de cromatografias. Assim, os retinóides talvez teriam sido degradados, oxidados ou isomerizados a outras formas,

pela incidência da luz em alguns momentos da extração e cromatografia, pela presença de oxigênio, mesmo que limitada a alguns minutos, e até mesmo pela luz UV que foi utilizada para monitorar a cromatografia por HPLC antes da análise por espectrometria de massas.

Figura 16. Resultados obtidos por espectrometria de massas das amostras cromatografadas por TLC (sistema III) e recromatografado por HPLC (sistema I). Foram analisadas as frações coletadas do HPLC correspondentes ao padrão de retinal (A). (Continua)

Figura 16. Resultados obtidos por espectrometria de massas das amostras cromatografadas por TLC (sistema III) e recromatografado por HPLC (sistema I). Foram analisadas as frações coletadas do HPLC correspondentes ao padrão de retinal (A), retinol (B) e ácido retinóico (C), extraídas de 5×10^{12} eritrócitos não parasitados, $1,07 \times 10^{13}$ esquizontes e 1 mL de meio de cultura. A caixa vermelha destaca o íon mais abundante observado para cada padrão. Os resultados obtidos de parasitas, eritrócitos não parasitados e meio RPMI foram normalizados para o íon mais abundante entre eles.

Para a segunda análise por ESI-MS, utilizamos uma quantidade um pouco menor de parasitos, mas modificamos o sistema de cromatografia. Reduzimos a apenas uma cromatografia para evitar a degradação, e não monitoramos por UV com o mesmo intuito. O sistema de extração também foi modificado para um que permite maior recuperação dos retinóides (extração em fase sólida). No perfil da espectrometria de massas dos esquizontes não observamos os íons mais abundantes que caracterizam os retinóides por nós estudados (não mostrado).

4.3.1.5 Definição do precursor radioativo

Nas análises por HPLC

Cromatografamos parasitos metabolicamente marcados com [^3H]FPP, através da mesma metodologia de extração e cromatografia em coluna C_{18} (Fig. 4). O perfil radioativo (Fig. 17) foi semelhante ao observado para marcações com [^3H]GGPP.

Figura 17. Perfil radioativo da cromatografia em HPLC (c.p.m.) de $1,2 \times 10^{12}$ esquizontes e $1,25 \times 10^{12}$ eritrócitos não parasitados radioativamente marcados com [^3H]FPP. A extração foi realizada com a mistura de clorofórmio e metanol (sistema I de extração) O sistema utilizado foi: coluna C_{18} , com solvente isocrático acetonitrila: 1% acetato de amônio (4:1, v/v), com fluxo de 1,1mL/min (sistema de HPLC I). Os tempos de retenção dos padrões

Nas análises por TLC

No segundo sistema de TLC (hexano:acetona), cromatografamos parasitos marcados com [^3H]GGPP e com [^3H]FPP (Fig. 5B e 18), extraídos com clorofórmio e metanol (sistema I). Utilizamos $1,5 \times 10^{11}$ esquizontes para cada precursor radioativo, e observamos uma banda (R_f 0,25) que ocorreu independentemente do precursor utilizado, mas não corresponde a nenhum dos padrões utilizados.

Figura 18: Autoradiografia de parasitos metabolicamente marcado com [^3H]FPP. Foram analisados $1,5 \times 10^{11}$ esquizontes (Pf) e $2,5 \times 10^{11}$ eritrócitos não parasitados (E) extraídos com clorofórmio: metanol (sistema I de extração) e cromatografado em TLC (sistema II). Os R_f dos padrões de retinóides estão indicados pelas setas.

As análises com marcação radioativa feita com o [^3H]FPP não modificaram os resultados já observados na marcação com [^3H]GGPP, e por isso foram temporariamente abandonadas. O resultado obtido por espectrometria de massas foi importante para nos mostrar que não havia detecção de retinóides no *P. falciparum*, e não se tratava de um erro no uso do precursor metabólico.

4.3.1.6 Associação de cromatografias para análise de retinóides

Tentamos utilizar dois sistemas cromatográficos em sequência com o objetivo de promover maior limpeza da amostra, reduzindo a interferência que outras moléculas apresentaram na análise dos retinóides.

Testamos dois tipos de associações, a cromatografia por HPLC, coletando-se as frações com tempos de retenção dos retinóides e recromatografando por TLC, ou iniciando pela cromatografia por TLC, recuperando o R_f de interesse raspando a região e recromatografando através do HPLC.

Na primeira associação, utilizamos a metodologia de cromatografia em coluna C_{18} (sistema I) de parasitos metabolicamente marcados com $[^3H]GGPP$, extraídos com clorofórmio e metanol (sistema I). Foram testadas duas concentrações diferentes de parasitos: cerca de 1×10^{12} , e $4,8 \times 10^{12}$. Após a coleta das frações com tempos de retenção dos retinóides eluídas do HPLC, foram recromatografadas no sistema I de TLC (hexano: acetato de etila). A análise utilizando a quantidade menor de parasitos não permitiu a observação de bandas na autoradiografia da TLC. O resultado da autoradiografia da cromatografia de $4,8 \times 10^{12}$ parasitos foi semelhante ao já obtido quando os parasitos foram cromatografados somente por este sistema de TLC, sem a prévia limpeza da amostra em HPLC. Como os padrões de GGOH, FOH, GOH, GGPP, FPP foram os que mais contribuíram dificultando a análise dos perfis deste sistema de HPLC, acreditávamos que a exclusão destes intermediários na análise por TLC, facilitaria a detecção dos retinóides. Porém, esta recromatografia prejudicou a sensibilidade do método, e prejudicando a confiabilidade neste resultado.

A segunda forma foi cromatografar os parasitos extraídos segundo o sistema II (isopropanol, diclorometano e ácido acético glacial) em TLC de fase reversa (sistema III) e recromatografar pelo sistema I (acetonitrila: acetato de amônio) de HPLC. Foram utilizados $2,4 \times 10^{12}$ parasitos radioativamente marcados com $[^3H]GGPP$, e como neste sistema de TLC os três retinóides em estudo apresentavam o mesmo R_f (R_f 0,68), esta região foi raspada e recromatografada em coluna (sistema I de HPLC). Embora seja visível a redução de frações radioativas que interferem, o perfil continuou semelhante ao encontrado nas cromatografias

anteriores (Fig. 4). Essa semelhança entre os perfis radioativos obtidos indica que este sistema de TLC não foi eficaz na separação dos componentes radioativamente marcados que interferem na análise. Esta separação apresenta uma dificuldade que é a decisão entre uma maior recuperação, que se dá pela ampliação da área raspada, ou uma melhor separação.

Figura 19. Perfil radioativo (c.p.m.) obtido através da cromatografia em HPLC após pré-cromatografia em TLC de fase reversa. Esquizontes ($2,4 \times 10^{12}$) e eritrócitos não parasitados ($2,4 \times 10^{12}$) marcados com $[^3\text{H}]\text{GGPP}$. As amostras foram cromatografadas em coluna C_{18} , com solvente isocrático acetonitrila: 1% acetato de amônio (4:1, v/v), os tempos de retenção dos padrões estão indicados pelas caixas: RA (ácido retinóico), OL (retinol) e AL (retinal).

4.3.2 Vitamina K

As diversas formas da vitamina K apresentam moléculas muito semelhantes às das ubiquinonas, diferenciando-se apenas pelo anel, sendo benzoquinol nas ubiquinonas e naftoquinol nas formas da vitamina K, e podem ocorrer concomitantemente nos organismos (78). Como as ubiquinonas de 8, 9 e 10

unidades isoprênicas já foram caracterizadas em *Plasmodium falciparum* (24), escolhemos sistemas de HPLC que fossem capaz de separá-las das formas de vitamina K estudadas.

4.3.2.1 Padronização da cromatografia por HPLC

Além dos métodos de cromatografias utilizados para tentar verificar a biossíntese de vitamina K no parasito, uma outra foi testada, em que é feito um gradiente entre a fase móvel A (metanol: ácido acético 0,1% em solução aquosa, 95:5, v/v) e B (100% etanol). Por esta metodologia obtivemos os seguintes tempos de retenção: PK (45-46 min), MK-4 (28 min), GOH (4 min), FOH (5 min), GGOH (12 min), Q₆ (37 min), Q₉ (65-66 min). Os autores cromatografaram MK-4 (20,8 min) e PK (41,3 min) (95).

HPLC- sistema I

Os estudos da biossíntese de vitamina K foram iniciados através da cromatografia de parasitos metabolicamente marcados com [³H]GGPP em uma coluna C₁₈, e a fase móvel composta por acetonitrila: diclorometano: metanol (sistema I de HPLC). Parasitos no estágio de esquizonte ($1,12 \times 10^{12}$) e eritrócitos não parasitados (2×10^{12}) foram extraídos segundo o sistema I de extração (isopropanol: hexano), e cromatografados no sistema de HPLC descrito acima.

No perfil radioativo obtido (Fig. 20) não distinguimos frações radioativas nos tempos de retenção de ambas as formas da vitamina K, pois embora apresentem alta contagem radioativa, valores semelhantes são observados nas frações adjacentes, impossibilitando uma análise individualizada.

A alta contagem radioativa, e a dificuldade de observarmos frações radioativas individualizadas indicam a ocorrência de muitos compostos marcados interferindo, então para a cromatografia ficar mais adequada seria importante uma melhor limpeza da amostra antecedendo a separação cromatográfica.

Figura 20. Perfil radioativo da cromatografia em HPLC, sistema I. $1,12 \times 10^{12}$ esquizontes e 2×10^{12} eritrócitos não parasitados metabolicamente marcados com $[^3\text{H}]\text{GGPP}$ foram extraídos com isopropanol e hexano (sistema I de extração) e cromatografados em coluna C_{18} , eluídos com acetonitrila: diclorometano: metanol (sistema I de HPLC). Os tempos de retenção obtidos dos padrões de menaquinona (MK-4) e filoquinona (PK) estão indicados pelas setas.

4.3.2.2 Análise da biossíntese de vitamina K por cromatografia em TLC e recromatografia em HPLC

Tentamos excluir os grupos que interferiram na análise anterior (Fig. 20) separando através da cromatografia por TLC antes da cromatografia por HPLC. O sistema de TLC escolhido foi o de Cox e Gibson (90) (sistema I de TLC). $3,2 \times 10^{12}$ esquizontes e $2,5 \times 10^{12}$ eritrócitos não parasitados foram marcados com $[^3\text{H}]\text{GGPP}$ e extraídos com a mistura de isopropanol:hexano (sistema de extração I). O extrato foi cromatografado em TLC (sistema I) e a região correspondente à vitamina K foi raspada, extraída com acetona e cromatografada em HPLC (sistema I- C_{18} , acetonitrila: diclorometano: metanol). Antes das separações cromatográficas, foram adicionados padrões de vitamina K às amostras, e verificamos que o comportamento destes foi alterado na recromatografia em HPLC em relação aos padrões que só foram cromatografados no HPLC. Quando diretamente aplicados no HPLC, a

menaquinona eluiu aos 7 e 8 min, e a filoquinona aos 11 e 12 min, mas após cromatografia em TLC, tanto o padrão de menaquinona como o de filoquinona eluíram como nas mesmas frações por HPLC, aos 9 min. Sugerimos que durante a cromatografia por TLC ou durante a segunda extração para aplicar no HPLC a vitamina K tenha sofrido modificação em sua molécula. Como o padrão de menaquinona utilizado possui 4 unidades isoprênicas, assim como a filoquinona, a diferença entre estas é a saturação da cadeia isoprênica, a MK-4 possui as quatro unidades isoprênicas com uma insaturação, e a filoquinona possui a primeira unidade isoprênica insaturada e as demais saturadas. Possivelmente a modificação as tenham tornado semelhantes, como saturação das suas cadeias laterais.

O importante a ser considerado é que qualquer modificação que tenha ocorrido nos padrões também ocorreria nas moléculas de vitamina K biossintetizado pelo parasito, caso este processo esteja presente, e no perfil radioativo que obtivemos por essa análise (Fig. 21) observamos frações radioativas correspondentes aos padrões de vitamina K modificados (8-9 min). Essa radioatividade pode ser resultado da degradação da vitamina K que foi biossintetizada pelo parasito, ou algum outro composto que além de migrar junto da vitamina K na cromatografia de camada delgada (TLC) também tem este tempo de retenção na cromatografia por HPLC. A separação por TLC eliminou diversos produtos e intermediários que poderiam estar radioativamente marcados, por derivarem do GGPP. Os R_f dos padrões testados foram: prenóis de 6 a 24 unidades isoprênicas (distribuídos nos R_f de 0,64 a 0,81), fitol (0,52), Q_6 (0,85), Q_9 (0,87), Q_{10} (0,91), PK e MK-4 (0,93), α -tocoferol (0,83) e licopeno (0,97). Destes, apenas as ubiquinonas de cadeias laterais maiores (Q_9 e Q_{10}) poderiam ter sido raspadas e cromatografadas juntos no HPLC, mas que seriam separados nessa segunda cromatografia.

Figura 21. Perfil radioativo (c.p.m.) obtido após cromatografia por TLC e recromatografia por HPLC. Foram utilizados $3,2 \times 10^{12}$ esquizontes e $2,5 \times 10^{12}$ eritrócitos não parasitados, ambos marcados com $[^3\text{H}]\text{GGPP}$. Da cromatografia em TLC (placa de sílica, fase móvel composta por éter de petróleo: clorofórmio, 1: 4, v/v) foi obtido um extrato com menor diversidade de moléculas, que foi analisado pelo sistema I do em HPLC (coluna C_{18} , e fase móvel composta por acetonitrila: diclorometano: metanol, 70:20:10, v/v). O retângulo indica o tempo de retenção encontrado para os padrões de vitamina K após serem cromatografados em TLC. As setas indicam os tempos de retenção dos padrões diretamente cromatografados por este sistema de HPLC.

4.3.2.3 Análise da biossíntese de vitamina K por cromatografia em HPLC e recromatografia em HPLC ou TLC

Esquizontes ($3,2 \times 10^{12}$) e eritrócitos não parasitados ($2,5 \times 10^{12}$) metabolicamente marcados com $[^3\text{H}]\text{GGPP}$ foram cromatografados em HPLC (sistema II) após extração sólido-líquida (sistema II). As frações obtidas deste sistema de HPLC foram divididas em duas partes, e uma delas foi recromatografada em outro sistema de HPLC, que é constituído por um sistema gradiente de acetonitrila e isopropanol (sistema IV), e a outra em TLC (sistema I).

A recromatografia de parasitos não resultou em nenhuma banda detectada após exposição da placa auto-radiográfica à TLC por 7 dias (Fig. 22). Uma banda foi observada da cromatografia de eritrócitos não parasitados, mas não foi identificada.

Figura 22. Imagem da TLC de esquizontes e eritrócitos não parasitados cromatografados em TLC após separação por HPLC. Cerca de $3,2 \times 10^{12}$ parasitos no estágio de esquizontes e $2,5 \times 10^{12}$ eritrócitos não parasitados, metabolicamente marcados com $[^3\text{H}]\text{GGPP}$ foram cromatografados em HPLC (sistema que usa metanol e etanol, sistema II) após extração sólido-líquida (sistema de extração II). As frações correspondentes aos padrões de vitamina K nesse sistema foram coletadas, e metade do volume delas foram evaporadas, ressuspensas em clorofórmio: metanol (1:1, v/v) e cromatografadas por TLC, em placa de sílica e a fase móvel consistia da mistura clorofórmio: éter de petróleo (4:1, v/v). Os R_f dos padrões está indicado à esquerda e os valores dos R_f dos padrões e das bandas observadas estão à direita. Abaixo, MK-4 e PK indicam, respectivamente, as frações coletadas da cromatografia por HPLC com tempos de retenção correspondentes aos padrões de menaquinona e filoquinona.

No perfil radioativo obtido da recromatografia por HPLC, não observamos nenhuma fração radioativa em todo o cromatograma (Fig. 23). O perfil radioativo da recromatografia de parasitos foi semelhante ao obtido para os eritrócitos não parasitados. Mesmo nos primeiros minutos, correspondente ao tempo de retenção das frações de injeção, não observamos um aumento significativo de radioatividade, em consequência da eficiência da separação por TLC e da extração.

Iniciamos a cromatografia (HPLC) com $3,2 \times 10^{12}$ esquizontes, e como cada fração coletada foi dividida em duas partes iguais para recromatografia, podemos considerar que $1,6 \times 10^{12}$ é a quantidade de esquizontes analisada por HPLC e TLC nas recromatografias. Essa concentração de parasitas foi considerada suficiente para análise por cromatografia por HPLC em experimentos anteriores, indicando que houve uma grande perda por degradação. Já durante a padronização pudemos conferir que parte do padrão sofria degradação durante a recromatografia.

Outra modificação neste experimento foi a decisão de utilizarmos parasitos da cultura sem lisar os eritrócitos, pois acreditávamos que parte do conteúdo citoplasmático do parasito poderia ser perdido durante a lise da membrana do eritrócito, que poderia também atingir a membrana do *P. falciparum*. Assim, não podemos descartar a chance de a extração não ter atingido com grande eficácia as moléculas localizadas no interior do parasito, apesar de ser muito improvável por ser uma metodologia de extração muito utilizada em diversos organismos, e com alta taxa de recuperação da vitamina K, quando presente. Por isso a degradação parece ser a explicação mais lógica caso a biossíntese da vitamina K pelo parasito seja confirmada por outras metodologias.

Figura 23. Perfil radioativo de parasitos e eritrócitos não parasitados cromatografados por HPLC e recromatografados em outro sistema de HPLC. Foram utilizados $3,2 \times 10^{12}$ esquizontes e $2,5 \times 10^{12}$ eritrócitos não parasitados metabolicamente marcados com $[^3\text{H}]\text{GGPP}$. Eles foram extraídos em coluna de NH_2 (sistema II) e separados cromatograficamente por HPLC, utilizando o sistema de solventes composto por metanol e etanol (sistema II de HPLC), e as frações correspondentes aos tempos de retenção dos padrões de vitamina K foram coletados, evaporados e recromatografados por HPLC, no sistema de gradiente de acetonitrila e isopropanol, como descrito em material e métodos (Análise da biossíntese de vitamina K por cromatografia em HPLC e recromatografia em HPLC ou TLC). As frações colhidas nesse sistema foram evaporadas e medida a radioatividade através de um contador de c.p.m. após adição de líquido de cintilação.

4.3.2.4 RP-TLC

Parasitos metabolicamente marcados com $[^3\text{H}]\text{GGPP}$ foram analisados também através da cromatografia em TLC. Aproximadamente 5×10^{11} esquizontes foram extraídos segundo o sistema II e cromatografados em placa de fase reversa (sistema II). Não observamos nenhuma banda correspondente às duas formas de vitamina K em estudo (Fig. 24). Mas esta análise precisa ser repetida, pois utilizamos metade da quantidade de parasitos cromatografados por HPLC, e este última tem maior sensibilidade.

Esta metodologia é uma metodologia de TLC interessante em nosso trabalho, pois há uma boa separação entre as vitaminas K e os isoprenóides testados neste sistema, como mostrado na tabela 4. Apenas o poliprenóide de 7 unidades isoprênicas apresenta um R_f próximo ao R_f da menaquinona-4.

Figura 24: Auto-radioografia da placa de TLC para análise de vitamina K. Aproximadamente 5×10^{11} esquizontes (Pf) metabolicamente marcados com $[^3\text{H}]$ GGPP foram cromatografados em TLC utilizando a mistura de acetona: água (19:1, v/v) (sistema II de TLC para vitamina K). Eritrócitos não parasitados (E) foram utilizados como controle.

Tabela 4. R_f obtidos para a cromatografia em TLC de fase reversa com acetona: água (19: 1, v/v).

padrão	R_f
Geraniol	0,774
Farnesol	0,711
Geranilgeraniol	0,653
Fitol	0,579
Poliprenol 6IPP	0,568
K2	0,529
Poliprenol 7	0,516
Ubiquinona 6	0,492
Poliprenol 8	0,479
K1	0,424
Poliprenol 9	0,416
Poliprenol 10	0,368
Ubiquinona 9	0,340
Poliprenol 11	0,326
Ubiquinona 10	0,288
Poliprenol 13	0,237
Poliprenol 14	0,195
Poliprenol 15	0,163
Poliprenol 16	0,137
Poliprenol 17	0,111
Poliprenol 18	0,089
Poliprenol 19	0,074
Poliprenol 24	0,021

4.3.2.5 Espetrometria de massas

A análise por espectrometria de massas no aparelho ESI-MS foi repetida, com a quantidade de 1×10^{13} esquizontes, seguindo os mesmos procedimentos de extração e cromatografia já descritos na análise de vitamina K por espectrômetro de massas. Além da quantidade de parasitos, a diferença entre as análises foi que neste caso os parasitos foram isolados dos eritrócitos através da lise com saponina.

Identificamos os íons moleculares da filoquinona e da menaquinona-4 na amostra de esquizontes, e os perfis de quebra destes íons se assemelham aos observados para os padrões dessas vitaminas. Reproduzindo o resultado anterior.

Menaquinona-4

Esquizontes

Figura 25. Perfis de análise por espectrometria de massas de frações coletadas após cromatografia por HPLC de *P. falciparum*, com tempo de retenção correspondente à menaquinona. Aproximadamente 1×10^{13} parasitos no estágio de esquizontes foram extraídos em uma coluna de sílica (sistema II de extração), e cromatografados por HPLC em coluna C₁₈, eluídos com metanol e etanol (sistema II de HPLC). As frações correspondentes à menaquinona-4 foram evaporadas e analisadas no espectrômetro de massas. À direita estão os padrões de quebra do íon molecular

Figura 26. Perfis de análise por espectrometria de massas de frações coletadas da cromatografia por HPLC de *P. falciparum*, com tempos de retenção correspondentes ao padrão de filoquinona. Aproximadamente $1,07 \times 10^{13}$ parasitos no estágio de esquizontes foram extraídos em coluna de sílica (sistema II de extração), e cromatografados por HPLC em uma coluna C₁₈, eluídos com metanol e etanol (sistema II de HPLC). As frações correspondentes à filoquinona foram evaporadas e analisadas no espectrômetro de massas. Na figura está representada o íon mais abundante do padrão de filoquinona à esquerda, assim como os perfis de quebra destes íons à direita.

4.3.2.6 Microteste- glifosato

Para determinar a IC₅₀ do glifosato, que utilizaríamos como parâmetro para inibir a biossíntese de vitamina K, testamos diversas concentrações de glifosato, que variavam de 10 mM a 0,01 mM. Concentrações altas de glifosato como 10 mM

abaixavam o pH do meio de cultura, e essa variação foi ajustada adicionando-se bicarbonato de sódio na solução estoque de glifosato. Mas observamos a formação de bolhas, evidenciando a ocorrência de reação. O glifosato, que é um ácido pode ter reagido com o bicarbonato, liberando água, o sal e CO₂, sendo o gás que observamos. Por este motivo, resolvemos não acertar o pH.

Em nosso estudo, obtivemos o valor de IC₅₀ de 0,9607, muito maior em relação ao trabalho do grupo de Roberts *et al.* (32), que reportou o valor de 1,08 mM para uma completa inibição do crescimento dos estágios assexuais do *P. falciparum*. Resolvemos trabalhar com meio de cultura depletado de PABA e ácido fólico, pois poderiam interferir na ação do glifosato. Mas praticamente não foi observada alteração na IC₅₀ para 48h.

Também tentamos calcular a IC₅₀ para 72 e 96h, na tentativa de obter menores valores, mas não há grande diferença com o tratamento mais longo.

Para tentar reduzir o valor de IC₅₀ do glifosato realizamos o teste em meio depletado de ácido fólico e pABA, que são produtos da via do chiquimato, e estão presentes no meio RPMI usado nos microtestes. Os parasitos se desenvolveram bem quando cultivados neste meio depletado, mas não foi observada nenhuma mudança no valor de IC₅₀ do glifosato.

A busca por retinóides e vitamina K biossintetizados pelo *P. falciparum* foi feita através da separação de compostos radioativamente marcados por cromatografias. Utilizamos basicamente dois sistemas cromatográficos, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, High Performance Liquid Chromatography) e cromatografia em camada delgada (TLC, Thin Layer Chromatography). Nos dois sistemas a separação das moléculas ocorre por interação hidrofóbica com a fase estacionária. Na cromatografia por HPLC, utilizamos dois tipos de colunas, ambas de fase reversa: C₁₈ e C₃₀. O que as diferencia é o tamanho da cadeia que está ligada à sílica, sendo de 18 e 30 carbonos, respectivamente. Esta diferença confere um aumento da hidrofobicidade da fase estacionária, permitindo separar melhor as moléculas pela hidrofobicidade dos grupos acessíveis contida em suas superfícies. Outra característica que diferencia as colunas é o tamanho da sílica, que no caso da C₁₈ é de 5 µm, e no da C₃₀ é de 3 µm. O tamanho reduzido da sílica permite um maior ajuste das moléculas de sílica, resultando numa diminuição dos espaços entre elas, ou seja, dos poros por onde eluem as moléculas analisadas. Na cromatografia por TLC, utilizamos placas de fase normal (de sílica) ou de fase reversa (sílica com cadeia hidrofóbica acoplada).

Dada a dificuldade de obter parasitos em grande quantidade através da cultura in vitro, recorremos ao uso de marcadores metabólicos como forma de amplificar o resultado. Escolhemos um intermediário da via de isoprenóides, que é comum a biossíntese das duas vitaminas em estudo: o pirofosfato de geranylgeranila triciado ([³H]GGPP).

Neste trabalho o precursor radioativo foi utilizado com a intenção de diferenciar os produtos originados do metabolismo do *P. falciparum* de moléculas pré-existentes. Por outro lado, tivemos problemas na separação das moléculas que se apresentaram radioativamente marcadas. O [³H]GGPP é um precursor metabólico de um amplo espectro de componentes, pois a via de isoprenóides apresenta diversas ramificações após este ponto. Essas moléculas são semelhantes, dificultando a separação delas seja durante a extração ou pelas cromatografias utilizadas. Consequentemente a identificação dos produtos foi prejudicada.

5.1 Retinóides

A dificuldade apontada acima foi um empecilho no estudo da presença da biossíntese de retinóides no parasito, tanto quando analisamos por HPLC quanto por TLC. Na cromatografia por HPLC, frações radioativas com tempos de retenção próximos ao retinal e ácido retinóico (Fig. 4) dificultaram a identificação. Após cromatografia de outros padrões de isoprenóides, observamos que o farnesol e o geranilgeraniol apresentam tempos de retenção que se aproximam aos dos padrões de ácido retinóico e retinal, respectivamente, e dessa forma poderiam interferir na análise. Nesta cromatografia, a fração radiativa observada aos 23 min poderia corresponder ao geranilgeraniol formado a partir do GGPP radioativo por desfosforilação. Uma banda com o mesmo R_f do geranilgeraniol também foi observada na TLC de duas dimensões. A ocorrência de farnesol e geraniol já havia sido registrada quando utilizado o precursor metabólico [^3H]GGPP por de Macedo *et al.* (24).

Nas duas análises por cromatografia unidimensional em TLC não observamos bandas que correspondessem aos padrões de retinóides. Em uma delas verificamos a ocorrência de bandas com R_f iguais aos do farnesol e do GGPP (Fig. 5A). Recromatografamos pelo mesmo sistema uma quantidade de parasito vinte vezes maior, e o resultado foi bastante semelhante, exceto pela banda de R_f igual a 0,93 que não foi observada neste último caso (não mostrado). Essa banda, que não foi identificada parece apresentar características de uma molécula instável, como é o caso dos retinóides, além de possuir um R_f com valor muito semelhante ao encontrado para o retinal. Isso, somado ao resultado de HPLC, em que ocorreram frações radioativas com tempos de retenção semelhante às do ácido retinóico e retinal, nos levantava dúvidas sobre a origem da radioatividade observada em frações eluídas na cromatografia por HPLC para retinóides, resultados semelhantes ao mostrado na figura 4.

Na tentativa de eliminar os problemas de co-eluição de retinóides e outras moléculas que poderiam estar radioativamente marcadas quando o [^3H]GGPP é usado como precursor metabólico, optamos pela tentativa de utilizar a recromatografia. As recromatografias mostraram-se pouco interessantes porque

poderiam atuar aumentando a degradação dos compostos analisados, e não alcançaram o objetivo de eliminar os interferentes da amostra. Esse sistema deve ser muito bem planejado, para promover a separação adequada.

Com o mesmo intuito, modificamos o sistema de extração em fase sólida para um que utiliza uma coluna de amino. A extração em fase sólida apresenta as vantagens de separar os retinóides polares dos apolares, além de ter uma maior recuperação dos retinóides e maior eficiência na limpeza da amostra. Mas esta extração não foi capaz de separar o GOH, GGOH e FOH dos retinóides.

A fração obtida dessa extração e que conteria os retinóides mais polares, como o ácido retinóico, foi cromatografada em HPLC padronizado para análise do ácido retinóico. Seu perfil radioativo não revelou frações radioativas correspondentes ao ácido retinóico, que somado com os resultados de TLC unidimensionais nos sugeria que o ácido retinóico não era biossintetizado pelo parasito.

A segunda metodologia de cromatografia por TLC unidimensional e a cromatografia em duas dimensões foram importantes para elucidar sobre a possibilidade de biossíntese do retinal. Nas duas cromatografias não foi detectada nenhuma banda igual ou próxima ao valor de R_f do retinal.

Nesta TLC bidimensional ainda procuramos por banda correspondente ao R_f do retinol, mas nenhuma foi observada neste R_f , apenas uma correspondente ao R_f do geranilgeraniol. O R_f desta banda é um valor próximo ao encontrado para o ácido retinóico, mas não pode ser considerado porque a extração utilizada para esta análise separa o ácido retinóico da fração que foi cromatografada nesta TLC.

A cromatografia por TLC não é a mais indicada para estudar retinóides. Segundo Breemen e Huang (96), a técnica de purificação de retinóides mais utilizada é o HPLC tanto de fase normal como de fase reversa, porque apresenta condição moderada que é compatível com a sensibilidade desses compostos ao aquecimento, à luz e ao oxigênio. Dessa forma, seria importante utilizar um método mais sensível para detectar os retinóides, e confirmar que não eram biossintetizados pelo parasito.

A espectrometria de massas foi a metodologia usada para confirmar se seria possível encontrar os retinóides nos parasitos, para então podermos confirmar se eles seriam biossintetizados ou apenas adquiridos. Duas análises foram feitas por

ESI-MS (ion trap). Na primeira análise observamos pequenos picos do ruído que foram confundidos com a detecção de retinal e retinol. Para confirmar o resultado, a análise foi repetida em um outro aparelho, o Q-TOF.

O resultado obtido na espectrometria de massas por tempo de voo (Q-TOF), que apresenta alto nível de detecção, corroborava o resultado da TLC de duas dimensões. A análise por espectrometria de massas é interessante porque é muito mais específica, reduzindo as chances de interferência de outras moléculas, apesar de não permitir identificar se o composto em estudo seria biossintetizado ou adquirido pelo parasito do meio de cultura ou do hospedeiro.

Segundo o grupo de Mizuno *et al.* (97) o *P. falciparum* (cepa FCR-3) é capaz de incorporar retinol do meio nas culturas *in vitro*, e eles observaram uma taxa de incorporação de 1 pmol para cada 10^7 eritrócitos infectados a cada 24h. Considerando que utilizamos $1,44 \times 10^{13}$ esquizontes na análise para o Q-TOF, teríamos cerca de $1,44 \times 10^6$ pmol de retinol, valor que está acima do nível de detecção do Q-TOF, mas não foi o resultado que obtivemos. Nenhum outro estudo corroborou os resultados deles, nem foram mostrados os mecanismos responsáveis por esta captação.

A formação das cadeias isoprênicas é catalisada pelas poliprenil transferases, que podem utilizar diversos precursores para a concatenação, tais como o GGPP, o FPP e o IPP. Os retinóides são derivados do GGPP, e este, geralmente é biossintetizado a partir da ligação entre o FPP e mais dois IPP. Assim, tratando-se de marcação metabólica dos retinóides, o [^3H]GGPP representa um precursor mais específico que o [^3H]FPP, porque com este último, teríamos as moléculas derivadas do GGPP, e também outras moléculas que não têm o GGPP como intermediário. Por isso o GGPP foi o radioisótopo escolhido para iniciar este estudo. Mas, para considerando a possibilidade de nos parasitos a biossíntese de retinóides ocorrer sem o GGPP como intermediário, resolvemos utilizar também o [^3H]FPP.

As análises utilizando o [^3H]FPP como precursor radiotivo, não modificaram os resultados já observados na marcação com [^3H]GGPP, e por isso foram temporariamente abandonadas. Na cromatografia em TLC (sistema II) foi observada apenas uma banda, também observada na marcação com [^3H]GGPP. Como o FPP é precursor do GGPP era esperada uma quantidade maior de produtos marcados, e

não a redução do número de bandas. Essa redução pode ser resultado de uma marcação mais fraca, uma vez que o [³H]FPP seria o precursor de um maior número de compostos. Mas é possível que em alguns casos o [³H]FPP não seja utilizado, como indica a banda de R_f 0,16 (Fig. 5B), que foi fortemente marcada pelo [³H]GGPP e não é visualizada na marcação com o [³H]FPP (Fig. 18).

O resultado obtido por espectrometria de massas foi importante para nos mostrar que não havia detecção de retinóides no *P. falciparum*, e não se tratava de um erro no uso do precursor metabólico.

O receptor PPAR-γ-RXR (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ-Retinoic Acid Receptor) tem a capacidade de aumentar a atividade fagocítica por meio do receptor CD36 no macrófago. O receptor CD36 viabiliza a fagocitose de hemácias parasitadas não opsonizadas, que são as principais na defesa contra o *P. falciparum* de pacientes não imunes. A ativação por meio de agonistas deste receptor, como o ácido retinóico, contribui para redução da chance do desenvolvimento da malária severa (98). Assim, a biossíntese dos retinóides pelo *P. falciparum* poderia atuar como fator negativo para o seu desenvolvimento no ciclo intraeritrocitário, que seriam liberados na circulação sanguínea no momento do rompimento das hemácias, junto dos merozoítos, e desencadeando essa atividade fagocitária no sistema imune.

A via dos isoprenóides está presente no *P. falciparum* com diversos produtos já identificados, tais como as ubiquinonas (24), os dolicolis (20), as proteínas isopreniladas (21), e incluem-se também os carotenóides. Os carotenóides então devem apresentar uma atividade importante para o parasito, por exemplo, atuando como antioxidantes, e neste trabalho foi visto que não são convertidos a retinóides durante o ciclo intraeritrocitário. Mas não está descartada a hipótese de que ocorra essa conversão durante outras fases do ciclo de vida do parasito, nos quais ele não desencadearia um aumento da fagocitose por intermédio do receptor PPAR-γ-RXR.

5.2 Vitamina K

A menaquinona e a filoquinona são formas da vitamina K biossintetizadas por diferentes organismos, a menaquinona, que possui anel naftoquinona e cadeia

lateral com número variável de unidades isoprênicas, geralmente insaturadas, é biossintetizada por bactérias. A filoquinona, que tem uma cadeia lateral parcialmente insaturada e sempre composta por quatro unidades isoprênicas, é biossintetizada por cianobactérias e plantas.

Cromatografia por HPLC

Os resultados que obtivemos nas análises cromatográficas apresentam alguns indícios de biossíntese de vitamina K pelo parasito. Não é possível uma afirmação concreta, pois o resultado dependeu do sistema metodológico utilizado, necessitando de um estudo mais profundo.

Foram observadas frações radioativas correspondentes à menaquinona através das duas metodologias de cromatografia por HPLC. Na cromatografia de $1,0 \times 10^{28}$ parasitos em coluna C_{18} , foram detectadas frações radioativas, (aproximadamente 7200 c.p.m.) correspondentes à menaquinona. Mas cromatografando em coluna C_{30} , uma quantidade semelhante de parasitos ($1,28 \times 10^{12}$), não detectamos radioatividade nestas frações, apenas quando aumentamos para aproximadamente 2×10^{12} esquizontes pudemos detectá-la. Essa diferença poderia resultar de uma menor sensibilidade do sistema em coluna C_{30} , pois a radioatividade medida mesmo com o aumento de parasitos foi muito pouca, ou alguma manipulação poderia ter degradado a menaquinona - 4 na primeira cromatografia em C_{30} .

Na primeira cromatografia em coluna C_{18} os parasitos foram isolados dos eritrócitos através da lise com saponina, enquanto nas análises em coluna C_{30} os parasitos foram isolados por gradiente de Percoll. A cromatografia em coluna C_{18} foi repetida com parasitos isolados por separação em gradiente de Percoll, e o resultado anterior foi reproduzido. Dessa forma descartamos a possibilidade da diferença entre os resultados das cromatografias em colunas diferentes ser causada por esta etapa.

O sistema em coluna C_{18} foi proposto por Kamao *et al.* (88), e sugerida como mais adequada para análise da filoquinona, porque não separa a menaquinona de outros compostos com a eficiência necessária no caso de detecção por

fluorescência. No nosso caso não sabemos até que ponto ocorre essa interferência de compostos, pois eles só seriam detectados se radioativos, ou seja, se derivados da mesma via. Como testamos os padrões mais comuns da via MEP já identificados no parasito, a chance de ser um composto interferente já caracterizado em *P. falciparum* é reduzida. Temos ainda a possibilidade de a fração radioativa ser algum outro composto como os dolicois, que não foram testados nessa metodologia, ou algum outro produto ainda não caracterizado, além da menaquinona-4.

O sistema aplicado na cromatografia em coluna C₃₀ foi adaptado para a análise das vitaminas K e de retinóides, pois é descrita para análise de carotenóides. Essa metodologia apresenta uma conveniente separação dos isoprenóides (Tabela 2), e picos definidos.

Frações radioativas correspondentes à filoquinona foram observadas através da cromatografia de parasitos marcados em coluna C₃₀, mas com uma grande diferença na quantidade de c.p.m. medidos. Ocorreu uma redução aproximadamente 34 mil c.p.m. na segunda cromatografia, na qual foi utilizada maior quantidade de parasitos. Essa redução ocorreu apenas nas frações correspondentes à filoquinona, nas outras observamos um aumento considerável, indicando que esta situação não decorre de algum problema na extração. Poderia resultar de alguma degradação ou de alguma variação no metabolismo do parasito.

A ubiquinona de 8 unidades isoprênicas (Q₈) já caracterizada no *P. falciparum*, apresenta tempo de retenção próximo ao da filoquinona na cromatografia em coluna C₁₈. Nenhuma fração radioativa foi observada neste tempo de retenção, e este resultado já era previsto, visto que a cadeia lateral da Q₈ é biossintetizada a partir do FPP e não do GGPP, que foi o precursor radioativo utilizado. Neste caso é esperada a detecção de Q₉, e foi observada fração radioativa no tempo de retenção dela no perfil obtido da cromatografia em coluna C₃₀ (não mostrado). Na cromatografia em coluna C₁₈ o tempo de retenção da Q₉ é muito alto e não foi coletado para avaliação.

Nas cromatografias para análise de vitamina K utilizamos dois métodos de extração, uma utilizando apenas solventes orgânicos (sistema I), que foi utilizada nas primeiras cromatografias, mas que não apresentou uma boa limpeza da amostra, dificultando as análises cromatográficas por apresentar muitos interferentes. A

extração em fase sólida foi testada com padrões de vitamina K e mostrou-se bastante eficaz na limpeza e recuperação da vitamina. Essa metodologia utiliza coluna de sílica, e o eluente composto por hexano e éter dietílico, e está bem padronizada, apresentando apenas pequenas variações na proporção desse eluente, em alguns casos a proporção é de 96:4 (v/v), e em alguns casos é de 97:3 (v/v). Este sistema é utilizado tanto para extração de filoquinonas quanto para menaquinonas e a amostra analisada também é bastante variável (alimentos, soro humano, óleos, tecidos animais, entre outros) (95, 99, 100).

O princípio da extração em fase sólida é que somente alguns grupos de moléculas da amostra aplicada, que têm afinidade pela coluna, fiquem retidos na coluna de extração. Posteriormente, a fração contendo as moléculas de interesse é então liberada da coluna quando adicionada um outro eluente, que modifica a interação de certas moléculas com a fase sólida.

Espectrometria de massas

Para aumentar a ionização de ambas as formas da vitamina K, foi utilizado o iodeto de lítio. Obtivemos perfis que indicam a presença de menaquinona - 4 e filoquinona nas três amostras analisadas: esquizontes, hemácias e meio de cultura.

As amostras foram anteriormente cromatografadas em HPLC no sistema II, e assim confirma a adequada separação da MK-4 e da filoquinona por este sistema.

Os resultados indicam a biossíntese de menaquinona-4 pelo parasito, tanto o perfil da espectrometria de massas que indicam sua presença no parasito, quanto as análises através de marcação metabólica, que apresentaram frações radioativas correspondentes a menaquinona em dois sistemas cromatográficos diferentes, que indicam a biossíntese da vitamina.

Já a filoquinona, foi detectada por espectrometria de massas, e não conseguimos explicar porque ela somente foi detectada radioativamente nas análises em coluna C₁₈, de parasitos tratados com glifosato. A análise em ESI-MS foi feita das frações coletadas do HPLC (coluna C₁₈), mostrando que é um sistema

adequado para sua cromatografia. Frações radioativas correspondentes à filoquinona foram observadas nas análises em coluna C30.

Não é registrada a biossíntese das duas formas de vitamina K (filoquinona e menaquinona) num mesmo organismo. É mais comum a ocorrência de diversas formas da menaquinona num mesmo organismo, com um número variável de unidades isoprênicas na cadeia lateral, e as saturações dessas unidades também são variáveis. Essas outras formas não são comercialmente disponíveis e por isso não foram analisadas no nosso estudo, mas talvez as frações radioativas que observamos nas duas cromatografias correspondam a uma outra menaquinona, ou até a um outro composto não identificado.

A ocorrência da biossíntese de filoquinona, MK-7 e MK-8 já foram analisadas em três espécies de *Plasmodium*: *P. knowlesi*, *P. cynomolgi* e *P. berghei*. Nos resultados apresentados por eles também foi detectada a vitamina K no sangue, o que indica uma menor sensibilidade na análise através da espectrometria de massas. Eles também acompanharam o metabolismo através da cromatografia em TLC de parasitos marcados com [¹⁴C] ácido chiquímico, antecedida por uma etapa de separação para limpeza além da extração. Os nossos resultados neste trabalho indicam que uma etapa adicional no processo representa um ponto crítico para degradação da vitamina (101).

5.2.3 Inibição

O glifosato (N-(fosfonometil) glicina) é um herbicida que inibe a via do chiquimato, e consequentemente a biossíntese de folatos, vitamina K, vitamina E, ubiquinonas, e aminoácidos aromáticos. Roberts *et al.* (32) inibiram o crescimento *in vitro* do *Plasmodium falciparum* (clone D6) em 48 horas com 1,08 mM de glifosato. Nós encontramos um valor maior de inibição para o clone 3D7, sendo a IC₅₀ de 0,96.mM (Fig. 13), e somente com 10 mM conseguimos alcançar uma inibição total do crescimento em 48h. Não sabemos se essa diferença encontrada seria apenas em consequência das cepas utilizadas.

Analisando a ação do glifosato na biossíntese de vitamina K em *P. falciparum*, observamos que as frações radioativas da cromatografia de parasitos em HPLC na coluna C₁₈ não apresentaram redução, mas sim um aumento da detecção de radioatividade nas frações correspondente à menaquinona-4, e a detecção de filoquinona. O glifosato age sobre a enzima EPSP sintase (5-enolpiruvil chiquimato-3-fosfato sintase), sexta enzima da via do chiquimato, responsável pela formação do anel naftoquinona da vitamina K. Assim era esperada uma inibição da biossíntese de MK-4, e não seu aumento ou mesmo a biossíntese de uma outra forma da vitamina K. Esse aumento pode ter ocorrido por um erro na medida da quantidade de parasitos utilizados na análise, o que também justificaria a observação de frações radioativas correspondentes à filoquinona, que caso seja biossintetizada em quantidades muito baixas só visualizada neste sistema quando mais parasitos são analisados.

Assim, os resultados até o momento indicam a biossíntese de menaquinona-4 pelo parasito no estágio de esquizonte do ciclo de vida do *P. falciparum*. A biossíntese não foi investigada nos outros estágios, tanto do ciclo intraeritrocitário, quanto em outros ciclos. A biossíntese da filoquinona precisa ser confirmada.

Além de elemento da cadeia de transporte de elétrons, a vitamina K também pode atuar como antioxidante. Na forma de hidroquinona (reduzida) ela teria importante papel antioxidante principalmente em membranas, por sua característica hidrofóbica (102, 103). Esta função seria de grande importância para o *P. falciparum*, que é submetido ao stress oxidativo em diversas etapas de seu desenvolvimento. No ciclo intraeritrocitário, a presença de ferro e o grupo heme são os principais responsáveis pelo ambiente pró-oxidativo. O ferro propicia a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), através da reação de Fenton. O grupo heme é derivado do metabolismo da hemoglobina, e a maior parte deste composto é polimerizada a hemozoína, esta última, inerte. Caso seja confirmada a biossíntese de vitamina K pelo parasito, seria interessante verificar se a vitamina teria um papel de agente antioxidante no parasito.

6 CONCLUSÕES

6.1 Retinóides

- O *P. falciparum* não biossintetiza o retinal, retinol e ácido retinóico durante o ciclo intraeritrocitário.

6.2 Vitamina K

Nossos resultados indicam a biossíntese de menaquinona-4 no *P. falciparum*.

- A presença da filoquinona no *P. falciparum* foi confirmada por espectrometria de massas, mas sua biossíntese pelo parasito só foi observada através de uma metodologia de HPLC. É necessário um estudo mais profundo para confirmar esse resultado.
- Não conseguimos inibir a biossíntese da vitamina K com o herbicida glifosato.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sherman IW. Malaria. Parasite biology, Pathogenesis and protection. Washington, DC:ASM; 1998.
 2. Bruce-Chwatt LJ. Essential Malariology. London: William Heinemann Medical Books ; 1980.
 3. Toler S. The plasmodial apicoplast was retained under evolutionary selective pressure to assuage blood stage oxidative stress. *Med Hypotheses*. 2005;65(4):683-690.
 4. Joy DA, Feng X, Mu J, Furuya T, Chotivanich K, Krettli AU, *et al*. Early origin and recent expansion of *Plasmodium falciparum*. *Science*. 2003 Apr 11;300(5617):318-321.
 5. Charles M. Poser GWB. Illustrated history of malaria. New York: The Parthenon Publishing Group; 1999.
 6. Hay SI, Guerra CA, Tatem AJ, Noor AM, Snow RW. The global distribution and population at risk of malaria: past, present, and future. *Lancet Infect Dis*. 2004 Jun;4(6):327-336.
 7. Collins FH, Paskewitz SM. Malaria: current and future prospects for control. *Annu Rev Entomol*. 1995;40:195-219.
 8. Greenwood B, Mutabingwa T. Malaria in 2002. *Nature*. 2002 Feb 7;415(6872):670-672.
 9. Rolling back malaria. *TRD News*. 1999:1-2.
 10. Phillips RS. Current status of malaria and potential for control. *Clin Microbiol Rev*. 2001 Jan;14(1):208-226.
 11. White NJ. Antimalarial drug resistance. *J Clin Invest*. 2004 Apr;113(8):1084-1092.
 12. Campbell CC. Malaria: an emerging and re-emerging global plague. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 1997 Aug;18(4):325-331.
 13. Cruz Marques A. Human migration and the spread of malaria in Brazil. *Parasitol Today*. 1987 Jun;3(6):166-170.
 14. Ministério da Saúde; Secretaria de Vigilância Sanitária. Situação Epidemiológica da Malária no Brasil. Brasília: Ministério da Saúde; 2006.
 15. Taylor TE, Fu WJ, Carr RA, Whitten RO, Mueller JS, Fosiko NG, *et al*. Differentiating the pathologies of cerebral malaria by postmortem parasite counts. *Nat Med*. 2004 Feb;10(2):143-145.
 16. Cooke B, Coppel R, Wahlgren M. *Falciparum* malaria: sticking up, standing out and outstanding. *Parasitol Today*. 2000 Oct;16(10):416-420.
 17. Fast NM, Kissinger JC, Roos DS, Keeling PJ. Nuclear-encoded, plastid-targeted genes suggest a single common origin for apicomplexan and dinoflagellate plastids. *Mol Biol Evol*. 2001 Mar;18(3):418-426.
 18. Wilson RJ. Progress with parasite plastids. *J Mol Biol*. 2002 May 31;319(2):257-274.
-

19. Mbaya B, Rigomier D, Edorh GG, Karst F, Schrevel J. Isoprenoid metabolism in *Plasmodium falciparum* during the intraerythrocytic phase of malaria. *Biochem Biophys Res Commun*. 1990 Dec 31;173(3):849-854.
20. Couto AS, Kimura EA, Peres VJ, Uhrig ML, Katzin AM. Active isoprenoid pathway in the intra-erythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*: presence of dolichols of 11 and 12 isoprene units. *Biochem J*. 1999 Aug 1;341 (Pt 3):629-637.
21. Moura IC, Wunderlich G, Uhrig ML, Couto AS, Peres VJ, Katzin AM, *et al*. Limonene arrests parasite development and inhibits isoprenylation of proteins in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001 Sep;45(9):2553-2558.
22. Jomaa H, Wiesner J, Sanderbrand S, Altincicek B, Weidemeyer C, Hintz M, *et al*. Inhibitors of the nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis as antimalarial drugs. *Science*. 1999 Sep 3;285(5433):1573-1576.
23. Cassera MB, Gozzo FC, D'Alexandri FL, Merino EF, del Portillo HA, Peres VJ, *et al*. The methylerythritol phosphate pathway is functionally active in all intraerythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem*. 2004 Dec 10;279(50):51749-51759.
24. de Macedo CS, Uhrig ML, Kimura EA, Katzin AM. Characterization of the isoprenoid chain of coenzyme Q in *Plasmodium falciparum*. *FEMS Microbiol Lett*. 2002 Jan 22;207(1):13-20.
25. D'Alexandri FL, Kimura EA, Peres VJ, Katzin AM. Protein dolichylation in *Plasmodium falciparum*. *FEBS Lett*. 2006 Nov 27;580(27):6343-6348.
26. Carson CF, Riley TV. Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *J Appl Bacteriol*. 1995 Mar;78(3):264-269.
27. Hammer KA, Carson CF, Riley TV. In vitro activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil against dermatophytes and other filamentous fungi. *J Antimicrob Chemother*. 2002 Aug;50(2):195-199.
28. Lopes NP, Kato MJ, Andrade EH, Maia JG, Yoshida M, Planchart AR, *et al*. Antimalarial use of volatile oil from leaves of *Virola surinamensis* (Rol.) Warb. by Waiapi Amazon Indians. *J Ethnopharmacol*. 1999 Nov 30;67(3):313-319.
29. Rodrigues Goulart H, Kimura EA, Peres VJ, Couto AS, Aquino Duarte FA, Katzin AM. Terpenes arrest parasite development and inhibit biosynthesis of isoprenoids in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004 Jul;48(7):2502-2509.
30. Herrmann KM, Weaver LM. The Shikimate Pathway. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. 1999 Jun;50:473-503.
31. McConkey GA, Ittarat I, Meshnick SR, McCutchan TF. Auxotrophs of *Plasmodium falciparum* dependent on p-aminobenzoic acid for growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 May 10;91(10):4244-4248.
32. Roberts F, Roberts CW, Johnson JJ, Kyle DE, Krell T, Coggins JR, *et al*. Evidence for the shikimate pathway in apicomplexan parasites. *Nature*. 1998 Jun 25;393(6687):801-805.

33. McRobert L, McConkey GA. RNA interference (RNAi) inhibits growth of *Plasmodium falciparum*. Mol Biochem Parasitol. 2002 Feb;119(2):273-278.
34. McConkey GA. Targeting the shikimate pathway in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. Antimicrob Agents Chemother. 1999 Jan;43(1):175-177.
35. McRobert L, Jiang S, Stead A, McConkey GA. *Plasmodium falciparum*: interaction of shikimate analogues with antimalarial drugs. Exp Parasitol. 2005 Nov;111(3):178-181.
36. Dieckmann A, Jung A. Mechanisms of sulfadoxine resistance in *Plasmodium falciparum*. Mol Biochem Parasitol. 1986 May;19(2):143-147.
37. Fitzpatrick T, Ricken S, Lanzer M, Amrhein N, Macheroux P, Kappes B. Subcellular localization and characterization of chorismate synthase in the apicomplexan *Plasmodium falciparum*. Mol Microbiol. 2001 Apr;40(1):65-75.
38. Roberts CW, Roberts F, Lyons RE, Kirisits MJ, Mui EJ, Finnerty J, *et al*. The shikimate pathway and its branches in apicomplexan parasites. J Infect Dis. 2002 Feb 15;185 Suppl 1:S25-36.
39. Basu T, Dickerson J. Vitamins in human health and disease. Wallingford: CAB international; 1996.
40. McCollum EV. The paths to the discovery of vitamins A and D. J Nutr. 1967 Feb;91(2):Suppl 1:11-16.
41. Wolf G. A history of vitamin A and retinoids. Faseb J. 1996 Jul;10(9):1102-1107.
42. Moore T. Vitamin A and carotene: The absence of the liver oil vitamin A from carotene. VI. The conversion of carotene to vitamin A in vivo. Biochem J. 1930;24(3):692-702.
43. Karrer P, Morf R, Schoepp K. Zur Kenntnis des Vitamins A in Fischtranen. Helv Chim Acta. 1931;14:1431-1436.
44. Strickland S, Mahdavi V. The induction of differentiation in teratocarcinoma stem cells by retinoic acid. Cell. 1978 Oct;15(2):393-403.
45. Wang XD, Tang GW, Fox JG, Krinsky NI, Russell RM. Enzymatic conversion of beta-carotene into beta-apo-carotenals and retinoids by human, monkey, ferret, and rat tissues. Arch Biochem Biophys. 1991 Feb 15;285(1):8-16.
46. Kiefer C, Hessel S, Lampert JM, Vogt K, Lederer MO, Breithaupt DE, *et al*. Identification and characterization of a mammalian enzyme catalyzing the asymmetric oxidative cleavage of provitamin A. J Biol Chem. 2001 Apr 27;276(17):14110-14116.
47. von Lintig J, Vogt K. Vitamin A formation in animals: molecular identification and functional characterization of carotene cleaving enzymes. J Nutr. 2004 Jan;134(1):251S-256S.
48. von Lintig J, Vogt K. Filling the gap in vitamin A research. Molecular identification of an enzyme cleaving beta-carotene to retinal. J Biol Chem. 2000 Apr 21;275(16):11915-11920.

49. Napoli JL, Race KR. Biogenesis of retinoic acid from beta-carotene. Differences between the metabolism of beta-carotene and retinal. *J Biol Chem.* 1988 Nov 25;263(33):17372-17377.
50. Redmond TM, Gentleman S, Duncan T, Yu S, Wiggert B, Gantt E, *et al.* Identification, expression, and substrate specificity of a mammalian beta-carotene 15,15'-dioxygenase. *J Biol Chem.* 2001 Mar 2;276(9):6560-6565.
51. Mata NL, Moghrabi WN, Lee JS, Bui TV, Radu RA, Horwitz J, *et al.* Rpe65 is a retinyl ester binding protein that presents insoluble substrate to the isomerase in retinal pigment epithelial cells. *J Biol Chem.* 2004 Jan 2;279(1):635-643.
52. Xue L, Gollapalli DR, Maiti P, Jahng WJ, Rando RR. A palmitoylation switch mechanism in the regulation of the visual cycle. *Cell.* 2004 Jun 11;117(6):761-771.
53. Prado-Cabrero A, Scherzinger D, Avalos J, Al-Babili S. Retinal biosynthesis in fungi: characterization of the carotenoid oxygenase CarX from *Fusarium fujikuroi*. *Eukaryot Cell.* 2007 Apr;6(4):650-657.
54. Scherzinger D, Ruch S, Kloer DP, Wilde A, Al-Babili S. Retinal is formed from apo-carotenoids in *Nostoc* sp. PCC7120: in vitro characterization of an apo-carotenoid oxygenase. *Biochem J.* 2006 Sep 15;398(3):361-369.
55. Ruch S, Beyer P, Ernst H, Al-Babili S. Retinal biosynthesis in Eubacteria: in vitro characterization of a novel carotenoid oxygenase from *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Mol Microbiol.* 2005 Feb;55(4):1015-1024.
56. Wald G. The molecular basis of visual excitation. *Nature.* 1968 Aug 24;219(5156):800-807.
57. Spudich JL, Yang CS, Jung KH, Spudich EN. Retinylidene proteins: structures and functions from archaea to humans. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2000;16:365-392.
58. Nagel G, Ollig D, Fuhrmann M, Kateriya S, Musti AM, Bamberg E, *et al.* Channelrhodopsin-1: a light-gated proton channel in green algae. *Science.* 2002 Jun 28;296(5577):2395-2398.
59. Jung KH, Trivedi VD, Spudich JL. Demonstration of a sensory rhodopsin in eubacteria. *Mol Microbiol.* 2003 Mar;47(6):1513-1522.
60. Giguere V, Ong ES, Segui P, Evans RM. Identification of a receptor for the morphogen retinoic acid. *Nature.* 1987 Dec 17-23;330(6149):624-629.
61. Petkovich M, Brand NJ, Krust A, Chambon P. A human retinoic acid receptor which belongs to the family of nuclear receptors. *Nature.* 1987 Dec 3-9;330(6147):444-450.
62. Leid M, Kastner P, Chambon P. Multiplicity generates diversity in the retinoic acid signalling pathways. *Trends Biochem Sci.* 1992 Oct;17(10):427-433.
63. Levin AA, Sturzenbecker LJ, Kazmer S, Bosakowski T, Huselton C, Allenby G, *et al.* 9-cis retinoic acid stereoisomer binds and activates the nuclear receptor RXR alpha. *Nature.* 1992 Jan 23;355(6358):359-361.

64. Mangelsdorf DJ, Evans RM. The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell*. 1995 Dec 15;83(6):841-850.
65. Bentley R, Meganathan R. Biosynthesis of vitamin K (menaquinone) in bacteria. *Microbiol Rev*. 1982 Sep;46(3):241-280.
66. Johnson TW, Shen G, Zybailov B, Kolling D, Reategui R, Beauparlant S, *et al*. Recruitment of a foreign quinone into the A(1) site of photosystem I. I. Genetic and physiological characterization of phyloquinone biosynthetic pathway mutants in *Synechocystis* sp. pcc 6803. *J Biol Chem*. 2000 Mar 24;275(12):8523-8530.
67. Malkin R. On the function of two vitamin k[1] molecules in the PS I electron acceptor complex. . *FEBS Lett*. 1986 Nov 24;208(2):343-346.
68. Iverson TM, Luna-Chavez C, Cecchini G, Rees DC. Structure of the *Escherichia coli* fumarate reductase respiratory complex. *Science*. 1999 Jun 18;284(5422):1961-1966.
69. Olson RE. The function and metabolism of vitamin K. *Annu Rev Nutr*. 1984;4:281-337.
70. Price PA. Vitamin K-dependent formation of bone Gla protein (osteocalcin) and its function. *Vitam Horm*. 1985;42:65-108.
71. Booth SL, Peterson JW, Smith D, Shea MK, Chamberland J, Crivello N. Age and dietary form of vitamin K affect menaquinone-4 concentrations in male Fischer 344 rats. *J Nutr*. 2008 Mar;138(3):492-496.
72. Schurgers LJ, Vermeer C. Differential lipoprotein transport pathways of K-vitamins in healthy subjects. *Biochim Biophys Acta*. 2002 Feb 15;1570(1):27-32.
73. Trager W, Jensen JB. Continuous culture of *Plasmodium falciparum*: its impact on malaria research. *Int J Parasitol*. 1997 Sep;27(9):989-1006.
74. Lambros C, Vanderberg JP. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *J Parasitol*. 1979 Jun;65(3):418-420.
75. Okamoto T, Fukui K, Nakamoto M, Kishi T, Okishio T, Yamagami T, *et al*. High-performance liquid chromatography of coenzyme Q-related compounds and its application to biological materials. *J Chromatogr*. 1985 Jul 12;342(1):35-46.
76. Ito YL, Zile M, Ahrens H, DeLuca HF. Liquid-gel partition chromatography of vitamin A compounds; formation of retinoic acid from retinyl acetate in vivo. *J Lipid Res*. 1974 Sep;15(5):517-524.
77. Barua AB, Kostic D, Olson JA. New simplified procedures for the extraction and simultaneous high-performance liquid chromatographic analysis of retinol, tocopherols and carotenoids in human serum. *J Chromatogr*. 1993 Aug 11;617(2):257-264.
78. Schmidt CK, Brouwer A, Nau H. Chromatographic analysis of endogenous retinoids in tissues and serum. *Anal Biochem*. 2003 Apr 1;315(1):36-48.
79. Frolik CA, Tavela TE, Sporn MB. Separation of the natural retinoids by high-pressure liquid chromatography. *J Lipid Res*. 1978 Jan;19(1):32-37.

80. Urbach J, Rando RR. Isomerization of all-trans-retinoic acid to 9-cis-retinoic acid. *Biochem J.* 1994 Apr 15;299 (Pt 2):459-465.
81. Sani BP, Condon SM, Banerjee CK. Purification and properties of retinol- and retinoic acid-binding proteins from a transplantable mouse colon tumor. *Biochim Biophys Acta.* 1980 Jul 24;624(1):226-236.
82. Devery J, Milborrow BV. beta-Carotene-15,15'-dioxygenase (EC 1.13.11.21) isolation reaction mechanism and an improved assay procedure. *Br J Nutr.* 1994 Sep;72(3):397-414.
83. Pyka A, Sliwiok J. Chromatographic separation of tocopherols. *J Chromatogr A.* 2001 Nov 23;935(1-2):71-76.
84. Olson JA, Hayaishi O. The enzymatic cleavage of beta-carotene into vitamin A by soluble enzymes of rat liver and intestine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1965 Nov;54(5):1364-1370.
85. Sieradzan RR, Bottner WA, Fasco MJ, Bertino JS, Jr. Comparative effects of cefoxitin and cefotetan on vitamin K metabolism. *Antimicrob Agents Chemother.* 1988 Sep;32(9):1446-1449.
86. Hirauchi K, Sakano T, Notsumoto S, Nagaoka T, Morimoto A, Fujimoto K, *et al.* Measurement of K vitamins in animal tissues by high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection. *J Chromatogr.* 1989 Dec 29;497:131-137.
87. Wang L, Huang S. Determination of vitamins A, D, E and K in human and bovine serum, and B-carotene and Vitamin A Palmitate in Cosmetic and Pharmaceutical products, by isocratic HPLC. *Chromatographia.* 2002;55:289-296.
88. Kamao M, Suhara Y, Tsugawa N, Okano T. Determination of plasma Vitamin K by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection using Vitamin K analogs as internal standards. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2005 Feb 25;816(1-2):41-48.
89. De Rosso VV, Mercadante AZ. Carotenoid composition of two Brazilian genotypes of acerola (*Malpighia punicifolia* L.) from two harvests *Food Reserach Intern.* 2005;38(8-9):1073-1077.
90. Cox GB, Gibson F. The role of shikimic acid in the biosynthesis of vitamin K2. *Biochem J.* 1966 Jul;100(1):1-6.
91. Karr DE, Bibb WF, Moss CW. Isoprenoid quinones of the genus *Legionella*. *J Clin Microbiol.* 1982 Jun;15(6):1044-1048.
92. McCormick AM, Napoli JL, DeLuca HF. High-pressure liquid chromatography of vitamin A metabolites and analogs. *Methods Enzymol.* 1980;67:220-233.
93. Barua AB, Olson JA. Reversed-phase gradient high-performance liquid chromatographic procedure for simultaneous analysis of very polar to nonpolar retinoids, carotenoids and tocopherols in animal and plant samples. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1998 Apr 10;707(1-2):69-79.
94. Napoli JL. Quantification and characteristics of retinoid synthesis from retinol and beta-carotene in tissue fractions and established cell lines. *Methods Enzymol.* 1990;189:470-482.

95. Suhara Y, Kamao M, Tsugawa N, Okano T. Method for the determination of vitamin K homologues in human plasma using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chem*. 2005 Feb 1;77(3):757-763.
96. Van Breemen RB, Huang CR. High-performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry of retinoids. *Faseb J*. 1996 Jul;10(9):1098-1101.
97. Mizuno Y, Kawazu SI, Kano S, Watanabe N, Matsuura T, Ohtomo H. In-vitro uptake of vitamin A by *Plasmodium falciparum*. *Ann Trop Med Parasitol*. 2003 Apr;97(3):237-243.
98. Serghides L, Kain KC. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-retinoid X receptor agonists increase CD36-dependent phagocytosis of *Plasmodium falciparum*-parasitized erythrocytes and decrease malaria-induced TNF-alpha secretion by monocytes/macrophages. *J Immunol*. 2001 Jun 1;166(11):6742-6748.
99. Ferland G, Sadowski JA. Vitamin K1 (phyloquinone) content of edible oil: effects of heating and light exposure. *J Agric Food Chem*. 1992;40:1869.
100. Suvarna K, Stevenson D, Meganathan R, Hudspeth ME. Menaquinone (vitamin K2) biosynthesis: localization and characterization of the menA gene from *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 1998 May;180(10):2782-2787.
101. Skelton FS, Rietz PJ, Folkers K. Coenzyme Q. CXXII. Identification of ubiquinone-8 biosynthesized by *Plasmodium knowlesi*, *P. cynomolgi*, and *P. berghei*. *J Med Chem*. 1970 Jul;13(4):602-606.
102. Vervoort LM, Ronden JE, Thijssen HH. The potent antioxidant activity of the vitamin K cycle in microsomal lipid peroxidation. *Biochem Pharmacol*. 1997 Oct 15;54(8):871-876.
103. Fiorentini D, Cipollone M, Galli MC, Landi L. Antioxidant activity of reduced menadione in solvent solution and in model membranes. *Free Radic Res*. 1997 May;26(5):419-429.