Síntese de hemozoína e busca por novos modelos a fármacos antimaláricos: Ensaio *in vitro* da formação de b-hematina.

Patrícia M. Pauletti (PQ)[1]*, Alberto J. Cavalheiro, (PQ)[1]*, Dulce H. S. Silva (PQ)[1], Ian Castro-Gamboa (PQ)[1] e Vanderlan da S. Bolzani (PQ)[1]

[1]NuBBE- Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais - Instituto de Química - UNESP, C. P. 355, CEP 14800-900, Araraquara, SP.

pauletti_2003@.yahoo.com.br

Palavras Chave: *antimalárico, b-hematina, hemina*

Introdução

A malária, doença causada pelo *Plasmodium*, aflige mais de 300 milhões de pessoas causando, pelo menos, 1 milhão de óbitos anuais, tendo como agravante a resistência do parasita à quimioterapia e a falta de uma vacina eficaz.[1]

No vacúolo digestivo ácido, o *Plasmodium* degrada hemoglobina e utiliza os aminoácidos da globina para a síntese de suas proteínas. Nesse processo, heme tóxica é liberada, armazenando-se intracelularmente na forma de um polímero inerte conhecido como hemozoína ou pigmento malárico, onde o grupo propionato do heme está ligado ao Fe^{3+} do outro heme. Sendo assim, substâncias capazes de inibir a polimerização de heme podem servir de modelos na terapia da malária.[2]

Resultados e Discussão

Vários procedimentos experimentais têm sido descritos na literatura para a determinação da formação de β-hematina *in vitro*, visto que o heme tende a precipitar em condições de pH ácido.

A diferença na solubilidade do heme monomérico e/ou agregado em relação à β-hematina, em solventes orgânicos apróticos (DMSO), DSS e soluções levemente alcalinas de bicarbonato, tem sido usada no isolamento de β-hematina, que é separada por centrifugação. Na quantificação podem ser empregados métodos tais como espectrofotômetria (405 nm), CLAE, IV, radioisótopos e espectrofluorímetros.[3]

Metodologias descritas na literatura[4-8] foram testadas, sendo que a principal diferença entre elas é o tipo de tampão, fosfato ou acetato, pH 5,0 - 5,2, 3,8 e 2,7. É importante destacar que o ideal seria a utilização do pH 5,0 - 5,2, visto que este se aproxima do pH do vacúolo digestivo. A temperatura de encubação ideal seria de 37 °C, mas temperaturas de 60 e 70 °C, foram utilizadas com o intuito de acelerar a velocidade da reação. A formação de β-hematina foi confirmada em nossos experimentos pela presença das bandas em 1662 e 1207 cm^{-1} no IV (Figura 1).

Outra questão importante é a quantidade de heme utilizada no ensaio que varia na faixa de 1 mM até 2 mM. Isto pode ser um problema pois é uma quantidade razoável quando se trata de produtos naturais, a maioria das vezes isolados em quantidades ínfimas.

Experimentos empregando 100 μM de heme tornou impossível a sua quantificação e com 500 μM indicaram certa variação entre os valores obtidos nas diversas concentrações das substâncias testadas. Até o presente momento foram testados alguns padrões, como quina, cloroquina, mangiferina e extratos vegetais já estudados pelo grupo, como *Arrabidaea samydoides*, reconhecida por apresentar xantonas, e *Styrax ferrugineus* (*nor*-neolignanas).

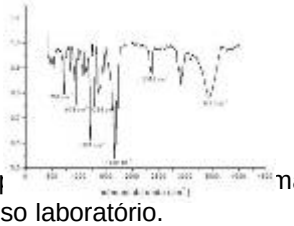

Figura 1: Espectro da β-hematina sintética obtida em nosso laboratório.

Conclusões

Um grande avanço foi dado em relação à implementação deste ensaio no NuBBE, no entanto uma limitante importante do métodos é a quantidade de material utilizado. A próxima etapa será resolver este problema e proceder à triagem da extratoteca e de outras substâncias isoladas pelo grupo.

Agradecimentos

À FAPESP, BIOTA-FAPESP, CAPES e CNPq pelo auxílio à pesquisa e bolsas concedidas.

1. http://www.who.int/topics/malaria/en/
2 Tripathi, A. K.; Khan, S. I.; Walker, L. A; Tekwani, B. L. *Anal. Biochem.* **2004**, *325*, 85.
3 Tekwani, B. L.; Walker, L. A. *Comb. Chem. High Through. Screen.* **2005**, *8*, 63.
4 Ignatushchenko, M. V.; Winter, R. W.; Bächinger, H. P.; Hinrichs, D. J.; Riscoe, M. K. *FEBS Letters* **1997**, *409*, 67.
5 Parapini, S.; Basilico, N.; Pasini, E.; Egan, T. J.; Olliaro, P.; Taramelli, D.; Monti, D. *Exp. Parasitol.* **2000**, *96*, 249.
6 Basilico, N.; Pagani, E.; Monti, D.; Olliaro, P.; Taramelli, D. J. *Antimicrob. Chemother.* **1998**, *42*, 55.
7 Baelmans, R.; Deharo, E.; Bourdy, G.; Muñoz, V.; Quenevo, C.; Sauvain, M.; Ginsburg, H. *J. Ethnopharmacol.* **2000**, *73*, 271.

[8] Ncokazi, K. K.; Egan, T. J. *Anal. Biochem.* **2005**, *338*, 30.