



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências da Saúde

O impacto do *stress* oxidativo e dos sistemas redox na malária.

Olavo Patrício de Almeida Miguel

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Ciências Biomédicas.
(2º ciclo de estudos)

Orientador: Prof. Doutor **António José Geraldês de Mendonça**

Covilhã, outubro de 2018

Dedicatória

Dedico este trabalho à minha mãe Esperança Escórcio de Almeida, à minha esposa Yurca Miguel, pela força e entusiasmo durante todos estes anos

Agradecimentos

Agradeço a Deus pai pelo dom da vida.

Aos meus pais Rafael Miguel Neto e Esperança Escórcio de Almeida, pela dádiva de vida.

À minha esposa Yurca Miguel, pelo seu apoio incondicional e às minhas princesinhas Yurca Miguel e Raiane Miguel por me servirem de fonte de inspiração.

À minha família em especial João Salvador e Engracia Salvador pelo apoio incondicional, por encherem-me de confiança nos momentos mais difíceis e por sempre acreditarem em mim, nunca me deixando desistir e por ajudarem a alcançar este objectivo.

Ao Prof. Doutor António José Geraldês de Mendonça pelas sábias correções, pelo tempo, saber e apoio incondicional prestado para que este trabalho fosse realizado.

A todos os colegas, em especial ao José Dembo, que durante estes anos de formação me brindaram com a sua sabedoria e amizade e com os quais partilhei momentos ímpares.

A todos que directa ou indirectamente contribuíram para a realização deste trabalho, o meu muito obrigado.

Resumo

A malária é um problema de saúde pública, significativo em mais de 100 países e gera cerca de 214 milhões de novas infecções por ano. Apesar do esforço significativo para erradicar essa doença perigosa, a falta de conhecimento sobre a sua fisiopatologia compromete o sucesso para a sua erradicação. Os parasitas protozoários do gênero *Plasmodium*, responsáveis por causar malária são extremamente recetivos ao *stress* oxidativo durante sua fase de vida intraeritrocítica, pois devoram a hemoglobina dentro de seus vacúolos e geram porções de heme tóxico e espécies reativas de oxigênio EROs. As espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN) estão associadas ao *stress* oxidativo em muitas doenças e nas complicações sistêmicas originadas pela malária. A infecção por malária provoca a formação de radicais hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), que é a principal razão para a indução de *stress* oxidativo e apoptose. As moléculas redox e o NO desempenham diversas funções no parasita e no hospedeiro mais concretamente no mecanismo de defesa do hospedeiro contra uma variedade de parasitas e infecções por protozoários, incluindo o *Plasmodium*. O objetivo deste trabalho consubstanciou-se em analisar o impacto do *stress* oxidativo e dos sistemas redox biológicos na Malária, com uma breve incursão sobre os potenciais benefícios do uso de suplementos antioxidantes de origem sintética ou natural como uma estratégia antimalárica adjuvante.

Palavras-chave:

Stress oxidativo; malária; radicais livres; antioxidantes.

Abstract

Malaria is a significant public health problem in more than 100 countries and generates about 214 million new infections per year. Despite the significant effort to eradicate this dangerous disease, the lack of knowledge about its pathophysiology compromises success for its total eradication. Protozoan parasites of the *Plasmodium* genus, responsible for causing malaria, are extremely receptive to oxidative stress during their intraerythrocytic life phase, as they devour hemoglobin within their vacuoles and generate portions of toxic heme and reactive oxygen species ROS. The reactive species of oxygen (ROS) and nitrogen (RNS) are associated with oxidative stress in many diseases and in the systemic complications originated by malaria. Malaria infection causes the formation of hydroxyl radicals ($\cdot\text{OH}$), which is the main reason for the induction of oxidative stress and apoptosis. The redox and NO molecules perform various functions in the parasite and the host more specifically in the host defense mechanism against a variety of parasites and protozoan infections, including *Plasmodium*. The objective of this work is to analyze the impact of oxidative stress and the biological redox systems in Malaria, with a small foray into the potential benefits of the use of antioxidant supplements of synthetic or natural origin as an adjuvant antimalarial strategy.

Keywords

Oxidative *stress*; malaria; free radicals; antioxidants.

Índice

1.Introdução.....	1
2- <i>Stress</i> oxidativo e malária.....	3
2.1- <i>Stress</i> oxidativo.....	3
2.2- Malária.....	7
2.2.1- Malária em Angola.....	8
2.2.2-Ciclo biológico do <i>Plasmodium</i>	9
2.2.3- Mecanismo de defesa antioxidante do parasita	12
2.2.4- Alterações Oxidativas no Hospedeiro Induzidas pelo <i>Plasmodium</i>	14
2.2.5- Malária e o <i>stress</i> oxidativo.....	17
2.2.6- O papel do NO na fisiopatologia da Malária	19
2.2.7- Resposta imunitária a infecção malárica no sangue.....	21
2.2.8- Biomarcadores Redox	23
2.2.9- Quimioterapia e seu Impacto no <i>stress</i> oxidativo.....	24
3- Fitoterapia e o impacto sobre o <i>stress</i> oxidativo.....	26
3.1- CPG	26
3.2- <i>Artemisia annua</i> L. (<i>Compositae</i>).	29
3.3-Casca da <i>Cinchona</i> (<i>rubiaceae</i>).....	32
3.4- <i>Copaifera reticulata</i> Ducke (<i>Fabaceae</i>) “copaíba”	35
3.5- <i>Flueggea virosa</i> e seu principal constituinte.	38
4-Conclusões e perspectivas futuras	41
5-Referências Bibliográficas	42

Lista de Figuras

Figura 1-Esquema representativo do <i>stress</i> oxidativo (Adaptado de Poljsak <i>et al.</i> , 2013).	3
Figura 2-Representação esquemática da formação de radicais livres (Pruchniak <i>et al.</i> , 2015).	3
Figura 3-Representação esquemática do ciclo de vida do parasita do género <i>Plasmodium</i> spp. (Adaptado de Pasvol, 2010).	9
Figura 4-Representação da degradação da hemoglobina e mecanismo de destoxificação do heme pelo <i>Plasmodium</i> (França, Santos & Figueroa-Villar, 2008).....	13
Figura 5-Estrutura da molécula de cloroquina (Müller & Hyde, 2010).	24
Figura 6-Estrutura do álcool 2- (6-benzoil-p-d-glucopiranosiloxi) -7-trihidroxi-3- oxociclo-hex-4-enoil) -5-hidroxibenzílico (CPG).	27
Figura 7-Estrutura da molécula de artemisinina (O'Neill <i>et al.</i> , 2010).....	29
Figura 8-Representação do mecanismo e alvos de ação das espécies radicalares formadas após ativação do centro ativo endoperoxídico (França, Santos & Figueroa-Villar, 2008).	30

Lista de Tabelas

Tabela 1-Principais espécies reativas de oxigénio (ERO) e nitrogénio (ERN). (Adaptado de Bhattacharyya <i>et al.</i> , 2014).	4
Tabela 2-Principais antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (dietéticos e endógenos) (Adaptado de Barbosa <i>et al.</i> , 2010).....	5

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACTs- terapias combinadas à base de artemisinina
CDC-Centros de Controle e Prevenção de Doenças
COXs-Ciclooxigenases
CPG-2-(6-benzoil-p-d-glucopiranosiloxi)-7-(1a, 2a, 6a-trihidroxi-3-oxociclo-hex-4-enil)-5-hidroxi-benzílico
CQ- Cloroquina
CTE- Cadeia de transporte de elétrons
CYP450- citocromo P450
EPCR- Recetor da proteína Endotelial
ERNs -Espécies Reativas de Nitrogênio
ERONs Fe- Espécies Reativas Derivados do Oxigênio, Nitrogênio e Ferro
EROs -Espécies Reativas de Oxigênio
FP- Ferritoporfirina
Hb- hemoglobina
IL-6-Interleucina seis
IFN- γ -interferon gama
IL-1 β - interleucina 1 β
LOXs-Lipoxigenases
MDA -Malondialdeído
MPO- Mieloperoxidase
MSP1- Proteína de superfície merozoíta 1
NAC- N-acetilcisteína
NADPH -Dinucleótido de adenina nicotinamida fosfato reduzido
NK- Célula natural *killer*
OMS- Organização Mundial de Saúde
PfEMP1- Proteína de membrana eritrocitária 1
PQ -Primaquina
RBC - Eritrócitos
SOD -Superóxido dismutase
SOD-Cu/Zn⁺ Superóxido Dismutase dependente de Cobre e Zinco
SOD-Fe⁺ Superóxido dismutase dependente de Ferro
SOD-Mn/Fe⁺ Superóxido dismutase dependente de Manganês e Ferro
SO-*Stress* Oxidativo
TAH- Transferência de átomo de hidrogênio
TBA -Ácido Tiobarbitúrico
TBARS -Substâncias reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
TE- Transferência de elétrons
TNF- α - fator de necrose tumoral α
XO- Xantina oxidase

1.Introdução

Segundo a Organização Mundial da Saúde, a malária continua a ser um grande problema de saúde pública em muitos países do mundo. Apesar do progresso na redução de casos e mortes por malária, estima-se que 214 milhões de casos de malária tenham ocorrido em todo o mundo em 2015, resultando em 438.000 mortes (WHO, 2015).

Os parasitas protozoários do género *Plasmodium* são responsáveis por causar malária no hospedeiro. É uma patologia atualmente endémica nas zonas tropicais com expansão no subtropical da Ásia, África, Américas do Sul e Central (WHO, 2016). De entre as espécies de *plasmodium* existentes, principalmente quatro espécies primárias de parasitas de malária infetam humanos: *Plasmodium falciparum*; *Plasmodium vivax*, *P. malariae* e *P. ovale* (WHO, 2016). Além disso, no Sudeste Asiático existe o *P. knowlesi*, parasita de malária que tipicamente envolve macacos como reservatório natural, podendo também infetar seres humanos e, em alguns casos, resultar em doença fatal (WHO, 2016). A maioria dos casos fatais, ocorrem principalmente em infeções por *P. falciparum*, resultando em anemia grave ou malária cerebral (WHO, 2011).

A infeção por malária provoca a geração de radicais hidroxilo \bullet OH, que provavelmente é a principal razão para a indução de *stress* oxidativo (Jacobson *et al.*, 2002). No entanto, estudos recentes sugerem que a geração de espécies reativas de oxigénio e nitrogénio (ERO e ERN) associadas ao *stress* oxidativo, desempenha um papel decisivo no aparecimento das complicações sistémicas causadas pela malária (Dey *et al.*, 2009).

Embora o *stress* oxidativo induzido seja um dos importantes mecanismos imunológicos do organismo durante a infeção por malária, o tempo e o nível de oxidantes produzidos é um dos principais determinantes do desfecho clínico (Nuchsongsin *et al.*, 2007). Além disso, o *stress* oxidativo induzido por antimaláricos é importante na eliminação do parasita da malária (Dey *et al.*, 2009). Em contraste, a produção excessiva de ERO pode exacerbar patologias associadas à malária, como anemia (devido à hemólise maciça), com eventual acidose metabólica (devido à redução da oxigenação dos tecidos em decorrência da anemia) e desconforto respiratório (Nuchsongsin *et al.*, 2007). O *stress* oxidativo induzido pela Ferriprotoporfirina IX (FT) causa dano à membrana eritrocitária oxidando-a e grupos sulfidrilo, conduzem peroxidação lipídica, e produzem deformação das hemácias causando encolhimento celular o que reduz o fluxo sanguíneo através da microvasculatura (Dey *et al.*, 2009). Esta condição pode levar ao bloqueio da microvasculatura e sustentar várias complicações da malária, tal como o aumento do sequestro de hemácias (incluindo hemácias não infetadas), o envolvimento cerebral e a falência múltipla de órgãos (Nuchsongsin *et al.*, 2007).

O objetivo deste estudo é analisar o impacto do *stress* oxidativo e dos sistemas redox biológicos na Malária. Desta forma, para a elaboração desta monografia procedeu-se a uma pesquisa bibliográfica de informação dos últimos 20 anos utilizando diversas fontes científicas, desde a consulta de livros relacionados com a temática em análise, como também de bases de dados científicas, entre as quais PubMed e Scielo.

O presente trabalho servirá de apoio aos estudantes do primeiro ano do curso de medicina na unidade curricular de bioquímica, da Universidade Agostinho Neto. Assim, apresentam-se os

Objectivos

Geral

Analisar o impacto do *stress* oxidativo e dos sistemas redox biológicos na Malária.

Objectivos de Aprendizagem

- Demonstrar conhecimento sobre as bases científicas da malária.
- Relacionar o *stress* oxidativo com o surgimento da malária.
- Compreender o impacto do *stress* oxidativo e dos sistemas redox na malária.
- Descrever o ciclo biológico do *Plasmodium*.
- Conhecer o papel do óxido nítrico na fisiopatologia da Malária.
- Conhecer a terapêutica da Malária e o seu impacto no *stress* oxidativo.
- Compreender os mecanismos quimio e fitoterapêuticos de fármacos implicados no tratamento antimalárico.
- Compreender o mecanismo de resposta imunitária à infeção malárica no sangue.
- Compreender o mecanismo de defesa antioxidante do parasita da malária.
- Conhecer os biomarcadores redox na malária.

propriedades tornam-nos doadores, ou recetores, de eletrões capazes de promover reações em cadeia e causar danos oxidativos (Halliwell & Gutteridge, 2015).

Algumas das espécies reativas de relevância biológica encontram-se na tabela 1. Para melhor compreensão deste fenómeno que é o *stress* oxidativo é crucial conhecermos as principais espécies reativas de oxigénio (ERO) e nitrogénio (ERN).

Tabela 1- Principais espécies reativas de oxigénio (ERO) e nitrogénio (ERN). (Adaptado de Bhattacharyya *et al.*, 2014).

Espécies Reativas		
Oxigénio	Nitrogénio	Estrutura Química
Radical superóxido		$O_2^{\bullet-}$
Radical hidroxilo		$\bullet OH$
Radical hidroperóxido		HO_2^{\bullet}
Peróxido de hidrogénio		H_2O_2
Oxigénio singleto		1O_2
	Radical óxido nítrico	NO^{\bullet}
	Óxido nitroso	N_2O_3
	Ião nitrito	NO_2^-
	Ião nitrato	NO_3^-
	Ião peroxinitrito	$ONOO^-$

A produção de EROs é temporária ou cronicamente elevada, alterando o metabolismo celular e danificando os componentes celulares (Lushchak, 2014).

O *stress* oxidativo é uma condição metabólica bem caracterizada na medicina humana, onde existem correlações desse distúrbio com o desenvolvimento de doenças crónicas e/ou degenerativas, a exemplo das doenças cardiovasculares, endócrinas, oncológicas e em infeções parasitárias, como a malária (Gottlieb *et al.*, 2010; Silva & Jasiulionis, 2014).

Apesar do potencial tóxico ao metabolismo, a produção das espécies reativas de oxigénio torna-se desejável em algumas situações (Almeida, 2013). Sabe-se que na fase inflamatória, durante a ativação máxima de neutrófilos e monócitos, diversas espécies como NO_2 e H_2O_2 , são produzidas e armazenadas com o objetivo de auxiliarem posteriormente na destruição de antigénios (Almeida, 2013). Apesar disso, uma boa defesa fisiológica, por parte dos antioxidantes, é fundamental para impedir a produção excessiva de agentes oxidantes e estes últimos gerarem *stress* oxidativo (Barbosa *et al.*, 2010). Os antioxidantes podem ser classificados como enzimáticos e não enzimáticos (Sousa *et al.*, 2010). Os mecanismos não enzimáticos podem ser divididos em endógenos e exógenos (Barbosa *et al.*, 2010). A tabela 2 apresenta exemplos de diferentes antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos.

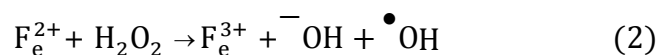
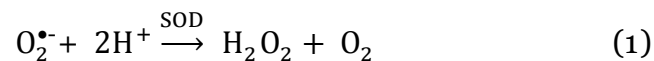
Tabela 2- Principais antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (dietéticos e endógenos) (Adaptado de Barbosa *et al.*, 2010).

Antioxidantes		
Enzimáticos	Não enzimáticos Dietéticos	Não enzimáticos Endógenos
SOD	Vitamina A	Coenzima Q10
CAT	Vitamina C	Ácido Úrico; Hemoglobina
GSH-Px	Vitamina E	Ceruloplasmina Transferrina
GSH-Rd	Cobre, Zinco, Manganês e Selénio	

As espécies reativas de oxigénio (EROs) são produzidas em vários sistemas celulares dentro da célula: membrana plasmática; citosol; peroxisomas; mitocôndrias; lisossomas e retículo endoplasmático (Di Meo *et al.*, 2016). As enzimas envolvidas na geração de ROS são: óxido nítrico sintase; peroxidases; isoformas da xantina oxidase (XO); lipoxigenases (LOXs); glicose oxidase; ciclooxigenases (COXs) e mieloperoxidase (MPO) (Bhattacharyya *et al.*, 2014). Além

disso, também existem fontes exógenas de EROs, que incluem poluição atmosférica, radiações ionizantes, metais pesados, solventes orgânicos, pesticidas e fármacos (Bhattacharyya *et al.*, 2014). As EROs derivam da redução de oxigénio que produz, através de várias etapas, importantes produtos intermediários: anião superóxido; peróxido de hidrogénio e radical hidroxilo (Bhattacharyya *et al.*, 2014). O anião superóxido $O_2^{\bullet -}$ é a ERO mais comum, que é gerada nas mitocôndrias pela cadeia transportadora de eletrões através da redução parcial de oxigénio (Bolisetty & Jaimes, 2013). A superóxido dismutase (SOD) é responsável pela produção de H_2O_2 a partir do anião superóxido, por meio de aminoácidos e xantina oxidase, ou por uma reação de dismutação (Ozcan & Ogun, 2015). Na presença de iões metálicos e aniões superóxido, o H_2O_2 pode produzir o radical hidroxilo ($\bullet OH$), que é o mais reativo e perigoso (Quinlan *et al.*, 2013; Ozcan & Ogun, 2015).

As equações 1 e 2 representam os processos de dismutação e a reação de Fenton respetivamente:



Normalmente nos quadros de *stress* oxidativo verifica-se o aumento da atividade sérica das enzimas antioxidantes em virtude da compensação contra a ação tóxica das espécies reativas. Da mesma forma, os marcadores diretos de lesão celular indicam atividade tóxica quando apresentam valores aumentados (Rebuglio *et al.*, 2013). Um exemplo é o malondialdeído (MDA), um importante marcador de peroxidação lipídica (Velloso *et al.*, 2013). Esta problemática dos marcadores biológicos será abordada com maior profundidade no ponto 2.2.8 sobre os biomarcadores redox.

A quantificação de antioxidantes não enzimáticos torna-se adequada para avaliar a atividade indireta do dano oxidativo (Russo & Bracarense, 2016). Normalmente, a diminuição da concentração desses analitos indicará falha na defesa antioxidante, sendo necessária a intervenção pela suplementação nutricional e farmacológica (Russo & Bracarense, 2016). Também a dosagem das proteínas de fase aguda, ceruloplasmina e ferritina, aliadas às dosagens dos metais como o Ferro e Cobre, são importantes dados bioquímicos que permitem maior exatidão na monitorização indireta do *stress* oxidativo (Ferreira & Abreu, 2007). O conhecimento do perfil bioquímico relativo às moléculas e iões referidos anteriormente auxilia no diagnóstico e tratamento do *stress* oxidativo (Russo & Bracarense, 2016).

2.2- Malária

O paludismo, ou malária, ainda é considerada uma das doenças mais devastadoras no mundo. Uma estimativa da Organização Mundial da Saúde (OMS) indica que mais de 40% (3,3 bilhões) da população mundial, distribuída por 106 países, apresenta risco de contrair a doença, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais, como África, Ásia e América Latina. Em 2010, foram registados 216 milhões de casos nos diversos continentes (Greenwood, 2008 ; Paschoal & Azevedo, 2009) permanecendo aproximadamente constante (214 milhões em 2015, WHO, 2015).

A malária é uma protozoonose dos eritrócitos, causada nos seres humanos por cinco espécies do género *Plasmodium* (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* e *P. knowlesi*) (Cox-Singh *et al.* 2008 ; Netto, 2013) transmitida pela picada do mosquito fêmea do género *Anopheles*. Em situações excepcionais, a doença pode ser transmitida por transfusão sanguínea e por via congénita (da mãe para o feto), embora estas duas formas de transmissão não tenham qualquer impacto epidemiológico (Netto, 2013).

Diversos estudos procuraram compreender a relação entre o *stress* oxidativo nos pacientes infetados pelo *Plasmodium spp*, e as respostas clínicas (Tilley *et al.*, 2001 ; Pabón *et al.*, 2003 ; Becker *et al.*, 2004 ; Yazar *et al.*, 2004 ; Jaramillo *et al.*, 2005 ; Mello, 2012 ; Kumar, 2006 ; Dey *et al.*, 2009). O equilíbrio entre os radicais livres gerados durante a infeção malárica, resultantes principalmente da ação do sistema imunológico e da degradação da hemoglobina, e as defesas antioxidantes do hospedeiro humano e do parasita influencia de forma significativa o prognóstico da doença (Muller *et al.*, 2001 ; Keller *et al.*, 2004).

2.2.1- Malária em Angola

A malária é a principal causa de morbidade e mortalidade em Angola. A doença levou a mais de três milhões de casos e 7999 mortes em todo o país em 2015. Nos últimos anos, o país obteve ganhos significativos na redução do número de casos de malária com medidas preventivas agressivas, gestão de casos e vigilância (Ministério da Saúde de Angola, 2015). Deste modo, tem influência no potencial de desenvolvimento do país pelos altos custos que acarreta (Velasco *et al.*, 2017).

A malária é endêmica nas 18 províncias do País, com a transmissão mais elevada registada nas províncias nortenhas (Cabinda, Uíge, Malange, Kuanza Norte, Lunda Norte e Lunda Sul), assim como na província de Luanda, devido à elevada densidade demográfica periurbana e deficientes condições de saneamento básico (Ministério da Saúde da RA, 2011). Nas províncias do Sul, Namibe, Cunene, Huíla e Kuando Kubango, ocorrem surtos epidémicos. Nota-se um aumento de transmissão durante a estação das chuvas, com um pico entre os meses de janeiro e maio (Ministério da Saúde da RA, 2011).

2.2.2-Ciclo biológico do *Plasmodium*

O ciclo de vida de *Plasmodium spp.* é bastante complexo, figura 3 e pode ser dividido em duas etapas distintas de reprodução, diferindo entre si em vários aspectos a nível fenotípico. A primeira etapa, que corresponde a uma fase de reprodução sexuada, ocorre no mosquito fêmea, da espécie *Anopheles spp* (Pasvol, 2010), Figura 3. Uma segunda etapa, em que ocorre uma fase de reprodução assexuada, ocorre em animais vertebrados, como seres humanos ou outros mamíferos (Pasvol, 2010), Figura:3.

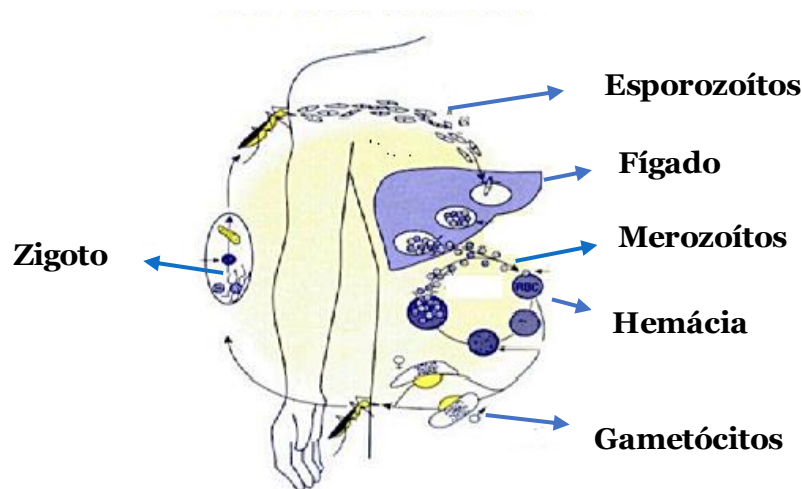


Figura 3-Representação esquemática do ciclo de vida do parasita do género *Plasmodium spp.* (Adaptado de Pasvol, 2010).

A infecção por malária humana é iniciada quando um mosquito *Anopheles* fêmea injeta esporozoítos de *Plasmodium* na pele durante uma refeição de sangue, Figura 3. Os esporozoítos atingem ativamente a circulação periférica e migram para o fígado, no qual se reproduzem dentro dos hepatócitos, formando merozoítos que são libertados na corrente sanguínea (Pasvol, 2010). Os merozoítos invadem os glóbulos vermelhos e desenvolvem-se através dos estágios de anel, trofozoíto e esquizontes (White, 2011). Após uma semana, os esquizontes rompem-se libertando merozoítos no sangue, que invadem os eritrócitos e continuam a replicação assexuada (Pasvol, 2010). Alguns diferenciam-se em gametócitos (estágio eritrocítico sexual), que quando ingeridos por outro mosquito *Anopheles* se transformarão em gâmetas masculinos e femininos que se juntarão para formar zigotos diploides (White, 2011). Os zigotos então invadem o intestino médio do mosquito, onde eles se

tornam oocistos, que então se rompem para libertar esporozoítos (Pasvol, 2010). Os segundos viajam para as glândulas salivares do mosquito, e o ciclo se repete a cada nova refeição de sangue (White, 2011). Os hipnozoítos são responsáveis pelas recidivas da malária, pois podem permanecer inativos no fígado por meses a anos (Pasvol, 2010).

Os sintomas clínicos da malária são em grande parte resultado da replicação dos estágios assexuais no sangue humano, mas a transmissão para os mosquitos só é alcançada através do desenvolvimento de estágios sexuais (Figura 3) denominados gametócitos (White, 2011). Para anular a transmissão do *P. falciparum*, devemos ser capazes de eliminar os estágios assexuados e sexuais do hospedeiro humano, eventualmente tornando um indivíduo não infeccioso para os mosquitos (White, 2011). No entanto, no caso de *P. vivax*, a eliminação é altamente desafiadora devido à recaída provocada por hipnozoítos dormentes no fígado que podem persistir como reservatório de transmissão por vários meses após a infecção inicial (Dembélé *et al.*, 2014). A falta de conhecimento suficiente sobre a infecciosidade de indivíduos assintomáticos e sintomáticos que abrigam estágios parasitários de transmissão continua a ser uma grande lacuna na compreensão da transmissão da malária (White, 2011; Dembélé *et al.*, 2014). Devido à relação complexa, e não-linear, entre a densidade parasitária no hospedeiro humano e a infecciosidade dos mosquitos (Schneider *et al.*, 2007; Bousema *et al.*, 2012; Churcher *et al.*, 2013). O nosso conhecimento sobre as estratégias usadas pelo parasita para uma transmissão eficiente, ainda está longe de estar completo (Schneider *et al.*, 2007). Alguns estudos destacam a medula óssea como o local primário de desenvolvimento e sequestro de gametócitos (Farfour *et al.*, 2012; Aguilar *et al.*, 2014; Joice *et al.*, 2014) levantam questões sobre o tempo de sequestração levando à reentrada de gametócitos maduros na circulação sanguínea e migração potencial para capilares subdérmicos durante uma infecção (Joice *et al.*, 2014). Como os gametócitos representam um potencial transmissor, é necessária uma compreensão mais profunda da biologia e bioquímica da transmissão para desenvolver novas ferramentas e estratégias para a eliminação e erradicação da malária (Farfour *et al.*, 2012; Aguilar *et al.*, 2014; Joice *et al.*, 2014).

2.2.2.1- Características da doença

Após a infecção por uma picada de mosquito, os sintomas aparecem após pelo menos uma semana. Na malária não complicada, os pacientes apresentam sinais e sintomas inespecíficos a cada 1, 2 ou 3 dias (CDC, 2010). Isso está relacionado com a duração do ciclo de vida do parasita, o *P. malariae* tem o ciclo mais longo de 72 horas, seguido por cerca de 48 horas para *P. falciparum* e *P. vivax* enquanto que o *P. ovale*. e *P. knowlesi* apresentam um ciclo mais curto de 24 horas. A infecção causada por *P. knowlesi* segue um curso semelhante ao da malária devido a *falciparum* e *vivax* (Singh & Daneshvar, 2013).

Os sintomas clínicos manifestam-se como resultado da libertação de substâncias residuais (por exemplo, hemozoína), que estimulam os macrófagos, e outras células imunitárias, a produzir citocinas e outros fatores (CDC, 2010). A gravidade da condição também é influenciada por fatores, tais como a composição genética do hospedeiro e a extensão da imunidade contra o parasita, cujas relações não estão bem estabelecidas (Oakley *et al.*, 2011). Podem ocorrer recaídas, semanas a meses depois, na malária causada por *P. vivax* e *P. ovale*. A malária grave ocorre quando há insuficiência de órgãos, complicações metabólicas ou hematológicas, e requer tratamento de emergência (CDC, 2010). Pode manifestar-se como malária cerebral, anemia grave, hemoglobinúria, síndrome do desconforto respiratório agudo, insuficiência renal aguda, hipotensão por colapso cardiovascular, hiper parasitemia, acidose metabólica e hipoglicemia (Oakley *et al.*, 2011).

2.2.3- Mecanismo de defesa antioxidante do parasita

Os parasitas do plasmódio estão sujeitos a altos níveis de *stress* oxidativo durante o desenvolvimento nas células do hospedeiro, de modo que a sua capacidade de defesa contra essa agressão é fundamental para a sua sobrevivência (Foth *et al.*, 2011). Como resultado, esses parasitas desenvolveram vários mecanismos de defesa antioxidante. (Foth *et al.*, 2011).

O estágio intra-eritrocítico do parasita da malária é o principal responsável pelas manifestações patológicas no hospedeiro (Miller *et al.*, 2002). Além disso, para compensar o *stress* oxidativo sofrido, o *Plasmodium* reduz a sua própria produção de espécies reativas de oxigênio e adota novos mecanismos para prevenir danos oxidativos decorrentes do hospedeiro (Foth *et al.*, 2011). O apicoplasto faz parte desses mecanismos (Miller *et al.*, 2002). O apicoplasto é um organelo intracelular simbiótico localizado perto da mitocôndria, que sintetiza o ácido lipóico, um potente antioxidante usado pelo parasita como defesa (Foth *et al.*, 2011). Muito provavelmente, este organelo foi incorporado como uma adaptação evolutiva do parasita, uma vez que este organelo também está presente como um simbionte em algas vermelhas (Toler, 2005).

Os sistemas redox (oxidação-redução) constituem um importante regulador das funções metabólicas celulares (Pal & Bandyopadhyay, 2011). As reações redox realizadas por diferentes enzimas são essenciais para o crescimento e desenvolvimento de parasitas dentro do hospedeiro (Pal & Bandyopadhyay, 2011). O parasita da malária é microaerofílico (0,5% -5,0% O₂) (Oliveira & Oliveira, 2002), e altamente suscetível ao *stress* oxidativo, mas reside em ambiente altamente oxigenado nos eritrócitos do hospedeiro (Becker *et al.*, 2004). Durante os estágios intra-eritrocitários, os parasitas são constantemente expostos a níveis elevados de *stress* oxidativo gerado por vários processos metabólicos exógenos e endógenos (Becker *et al.*, 2004). Os parasitas da malária enfrentam constantemente o desafio de desintoxicar grandes quantidades de heme livre, libertadas da hemoglobina (Hb) Figura 7 (Becker *et al.*, 2004). Além das espécies reativas de oxigênio mitocondriais, o parasita da malária é também alvo da resposta oxidativa (ou respiratória) do sistema imunológico do hospedeiro (Brunet, 2001). Assim, a desintoxicação de ERO produzida por causa da alta taxa metabólica do parasita em rápido crescimento e multiplicação é uma tarefa crucial para o parasita da malária (Brunet, 2001). O parasita da malária desenvolveu adaptações metabólicas distintas e estratégias de sobrevivência para acomodar-se sob essas restrições ambientais (Bandyopadhyay & Dey, 2011). Para lidar com o *stress* mediado pelo elevado nível de heme livre, o parasita converte heme em hemozoína menos tóxica (Hz) (Bandyopadhyay & Dey, 2011).

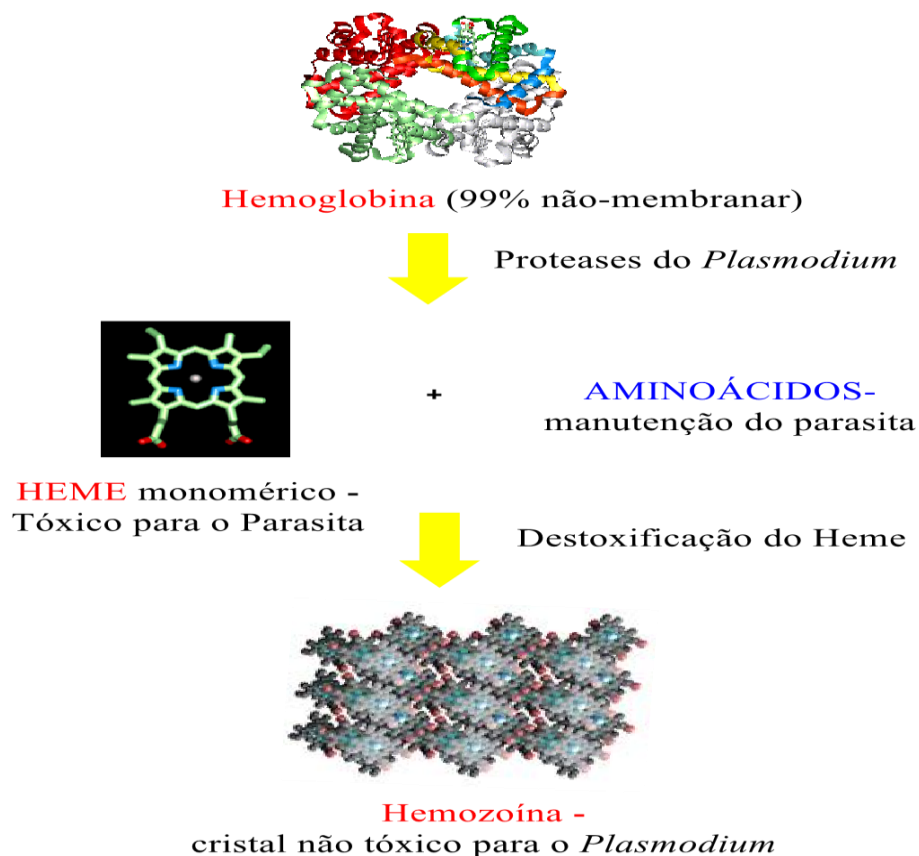


Figura 4-Representação da degradação da hemoglobina e mecanismo de destoxificação do heme pelo *Plasmodium* (França, Santos & Figueroa-Villar, 2008).

O parasita da malária também possui sistemas antioxidantes e redox. O sistema antioxidante e redox do parasita da malária é constituído principalmente pelos sistemas glutathiona (GSH); tiorredoxina (Trx) (Nickel *et al.*, 2006), ácido lipóico (LA); ácido dihidrolipóico (DHLLA) (Gunther *et al.*, 2009) e sistema glioxalase (Urscher *et al.*, 2010). Além dos sistemas antioxidantes, outras proteínas envolvidas nas reações redox são as desidrogenases do NADPH (desidrogenase do glutamato, desidrogenase glicose-6-fosfato e isocitrato desidrogenase) essenciais para o crescimento e sobrevivência do parasita (Jortzik *et al.*, 2011).

2.2.4- Alterações Oxidativas no Hospedeiro Induzidas pelo *Plasmodium*

Em resposta à infecção causada por parasitas de *Plasmodium*, o mecanismo natural de defesa do hospedeiro é ativado com o envolvimento de fagócitos (macrófagos e neutrófilos) (Kavishe *et al.*, 2006). Estes, por sua vez, geram grandes quantidades de ERO e ERN, causando um desequilíbrio entre a formação de espécies oxidantes e a atividade de antioxidantes. Esse desequilíbrio é o que desencadeia o *stress* oxidativo (Figura 1) que é um mecanismo importante dos hospedeiros humanos em resposta às infecções e, no caso da malária, pode levar à morte dos parasitas (Kavishe *et al.*, 2006).

Estudos *in vitro* demonstraram a capacidade do *stress* oxidativo em promover a morte de parasitas (Kavishe *et al.*, 2006; Poljsak *et al.*, 2013). Com efeito, a incubação de espécies de *Plasmodium yoelii* na presença de glicose e glicose oxidase gerou H_2O_2 , uma espécie reativa de oxigênio, capaz de matar o parasita (Poljsak *et al.*, 2013). Da mesma forma, quando incubada na presença de xantina e xantina oxidase, gerou o radical livre ($O_2^{\cdot-}$) superóxido e outros produtos oxidativos, com consequente destruição de parasitas (Kavishe *et al.*, 2006).

A importância das espécies radicalares na gênese das alterações fisiopatológicas em pacientes com malária sugere que deve ser evitada a reposição de ferro em indivíduos infetados, apesar do grau de anemia observado pela contagem de eritrócitos (Hassan *et al.*, 2004; Caufield *et al.*, 2004).

Juntamente com a síntese de espécies radicalares, os organismos desenvolveram diferentes mecanismos de defesa antioxidante em resposta ao aumento do *stress* oxidativo (Caufield *et al.*, 2004). Na verdade, a defesa antioxidante é um mecanismo fisiológico dos organismos contra os danos causados pelos radicais livres e depende do consumo de reservas antioxidantes celulares e sistêmicos (Caufield *et al.*, 2004). A síntese endógena destes compostos antioxidantes consiste tipicamente em três sistemas interdependentes: enzimáticos; pequenas moléculas e quelação de metais, que retardam ou impedem a oxidação de biomoléculas (Percario *et al.*, 2008). O sistema de defesa antioxidante também evita a geração de espécies oxidantes por eliminação, ou pela redução de radicais livres, que por auto-oxidação formam compostos menos reativos (Percario *et al.*, 2008).

Embora várias enzimas antioxidantes sejam importantes no sistema de defesa, as mais importantes incluem GSH-Px, catalase e SOD referidos na Tabela 2. Estas enzimas atuam diretamente sob alguns radicais livres, inativando-os (Caufield *et al.*, 2004). No entanto, elas não são capazes de atuar sobre os radicais livres mais reativos, tal como os radicais hidroxilo e peroxinitrito, que são os principais responsáveis por processos patológicos oxidativos (Percario *et al.*, 2008). Em resultado disto, o nosso corpo usa pequenas moléculas que reduzem

a reatividade de vários radicais reativos como um sistema auxiliar de defesa antioxidante. Este grupo contém um grande número de moléculas, tais como vitaminas A, C e E, beta-caroteno, ácido úrico e molécula de glutathiona reduzida (GSH) também referidos na Tabela 2. Além disso, o nosso organismo possui proteínas que se ligam a metais de transição impedindo-os de catalisar a reação de Fenton, Equação (2), importante fonte de produção de espécies reativas (Rosales *et al.*, 2000). Estes quelantes de metais incluem ferritina, transferrina e lactoferrina (quelante de ferro), ceruloplasmina e albumina (quelantes de cobre) e metalotioneínas possuindo grupos tiol capazes de ligar vários metais pesados (Percario *et al.*, 2008).

Entre as moléculas antioxidantes, a molécula de GSH destaca-se como sendo a mais poderosa protetora de células eucarióticas na defesa do hospedeiro contra o *stress* oxidativo, atuando sobre vários mecanismos diferentes (Rosales *et al.*, 2000). Paralelamente, a secreção do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) parece induzir o *stress* oxidativo através da modulação do metabolismo da GSH, desempenhando um importante papel na fisiopatologia da malária (Percario *et al.*, 2008). Em estudos com ratos, a administração de TNF- α induziu diminuição dos níveis de GSH, enquanto em células TCD4 + e CD8 + esplênicas, um aumento significativo ocorreu na glutathiona oxidada (GSSG) (Sales *et al.*, 2001). Assim ambos os comportamentos sugerem aumento do *stress* oxidativo. Vários autores relataram diminuição do GSH em pacientes com malária (Rosales *et al.*, 2000; Halliwell & Gutteridge, 2007).

No entanto, além da GSH, níveis mais baixos de vários antioxidantes são encontrados em pacientes com malária causada por *Plasmodium vivax*: glutathiona S-transferase (GST) (Haynes & Krishna, 2004; Dumaswala *et al.*, 2001); catalase; GSH-Px; SOD (Becker *et al.*, 2004; Sales *et al.*, 2001), NADPH metemoglobina redutase (Becker *et al.*, 2004); quelantes de metais pesados como desferrioxamina; salicilaldeído; isonicotinoil (Dumaswala *et al.*, 2001); ferritina (Sales *et al.*, 2001); pequenas moléculas, como vitaminas A, E, C (Kavishe *et al.*, 2006); pró-vitaminas α e β -caroteno; licopeno; luteína e zeaxantina (Becker *et al.*, 2004), entre outras.

Da mesma forma, os pacientes com malária por *Plasmodium falciparum* apresentaram menores níveis de antioxidantes, como o ascorbato, que se correlacionou com a gravidade da doença, em contraste com níveis elevados de urato e ceruloplasmina (Kavishe *et al.*, 2006). Assim, o aumento dos níveis de urato pode indicar a presença de síndrome de isquemia-reperfusão (IRS) responsável pela produção de radicais livres em condições isquêmicas ou mesmo em hipóxia devido à hemólise e citoaderência induzidas por parasitas (Sohail *et al.*, 2007).

Da mesma forma, a diminuição da atividade da GST está diretamente relacionada à gravidade da parasitemia, uma vez que a produção dessa enzima reduz as complicações da malária e a

ocorrência de malária grave (Sales *et al.*, 2001). Nesse sentido, a avaliação dos níveis de GST, peroxidação lipídica e catalase, pode ser considerada como potenciais marcadores bioquímicos de gravidade da doença (Halliwell & Gutteridge, 2007).

2.2.5- Malária e o stress oxidativo

Tal como referido no ponto 2.2.2 o *Plasmodium* passa por um ciclo de vida complexo, alternando entre dois hospedeiros, vertebrados e invertebrados, com diferentes ambientes e fisiologias (Muller, 2004). Além disso, no interior destes dois hospedeiros, o parasita também existe como formas intra e extracelulares sendo, desse modo, expostas a ambientes extremos. O *Plasmodium* sofre um stress oxidativo significativo durante o ciclo dos eritrócitos, dado que eles se encontram num ambiente oxidante nos glóbulos vermelhos devido ao oxigénio e ferro (Muller, 2004).

O *Plasmodium* digere a hemoglobina dentro do seu vacúolo ácido e liberta a ferriprotoporfirina IX (FP) tóxica e espécies reativas de oxigénio (ERO) (Combrinck *et al.*, 2002). Normalmente, a maior parte da FP libertada é polimerizada em hemozoína cristalina ou pigmento de malária (Combrinck *et al.*, 2002) mas uma quantidade significativa escapa à polimerização e tem de ser desintoxicado no citoplasma (Zhang *et al.*, 1999). A FP livre pode interagir com membranas fosfolipídicas causando alterações estruturais devido à reatividade do ião Fe^{3+} com lípidos de membrana insaturados (Zhang *et al.*, 1999). Isso pode levar ao aumento da permeabilidade da membrana para iões; aumento de volume das células e lise (Famin *et al.*, 1999). Esta fração de FP é desintoxicada por vias dependentes de glutatona e proteínas de ligação a FP do parasita e do hospedeiro (Famin *et al.*, 1999). O sistema imune do hospedeiro, em resposta à apresentação de antígeno ou em resposta a parasitas sequestrados, secreta várias citocinas, incluindo o fator de necrose tumoral α (TNF α) que desencadeia reações inflamatórias que conduzem ao aumento da ERO (Figueiredo *et al.*, 2007). Além disso, a reoxigenação de tecidos hipóxicos, que foram bloqueados por parasitas, pode contribuir para a produção de ERO (Becker *et al.*, 2004). Além disso, os pacientes com *P. falciparum* ou malária *P. vivax* são reportados em vários trabalhos como apresentando menor atividade de catalase do que indivíduos não infetados, mas apresentam uma maior atividade de superóxido dismutase (SOD), (Pabon *et al.*, 2003). O aumento da atividade da SOD, juntamente com a redução da atividade da catalase, pode levar à acumulação de H_2O_2 que pode rapidamente reagir com o ferro da FP para formar radicais hidroxilo, promovendo dano nos tecidos (Seixas *et al.*, 2009). Como produto da peroxidação lipídica, o malondialdeído (MDA) tem sido sugerido como biomarcador do stress oxidativo na malária, (Pabon *et al.*, 2003; Moreira, 2017). Outros biomarcadores de stress oxidativo na malária incluem SOD-1 humana (Cu / Zn-SOD), TNF- α , catalase e glutatona peroxidase (Percario *et al.*, 2012; Megnekou *et al.*, 2015).

Os merozoítos e antígenos de *Plasmodium falciparum* induzem a produção de EROs, por leucócitos polimorfonucleares e mononucleares (Kharazmi *et al.*, 1987). A estimulação de granulócitos extraídos de pacientes com malária com TNF- α levou à produção elevada de EROs (Greve *et al.*, 1999). Além disso, os níveis plasmáticos de citocinas, incluindo recetores de TNF-

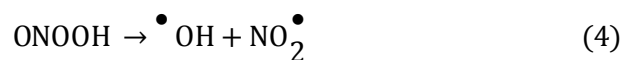
α , interleucina-6, interleucina-8 e TNF, são mais altos em indivíduos com malária grave por *P. falciparum* do que com malária não complicada (Kremsner *et al.*, 1995). Curiosamente, tais níveis elevados de TNF- α durante a fase aguda da infecção por malária associaram-se à redução rápida do parasita, mas não à cura clínica (resolução de sinais clínicos) após o tratamento antimalárico (Gomes, 2011). Deste modo, enquanto o *stress* oxidativo induzido é um dos importantes mecanismos imunológicos do organismo durante a infecção por malária, o tempo e o nível de oxidantes produzidos é um fator determinante do desfecho clínico (Kremsner *et al.*, 1995; Gomes, 2011). Parece que a alta e rápida produção de EROs durante a fase aguda da infecção pode ser benéfica na eliminação da parasitemia, enquanto a estimulação crônica de EROs é prejudicial para as células do hospedeiro, particularmente para os eritrócitos (Kremsner *et al.*, 1995; Gomes, 2011).

Acredita-se que o *stress* oxidativo induzido pela ferriprotoporfirina IX cause danos às membranas dos eritrócitos por meio da oxidação dos grupos sulfidrilos e através da peroxidação lipídica, reduzindo a deformabilidade dos glóbulos vermelhos e causando o encolhimento celular (Nuchsongsin *et al.*, 2007), que reduz o fluxo sanguíneo através da microvasculatura. O uso de antioxidantes como a N-acetilcisteína (NAC) mostrou reverter algumas dessas condições, embora não completamente (Kawazu *et al.*, 2008). Por exemplo, a NAC foi capaz de reverter a deformabilidade das hemácias, mas não o volume celular (encolhimento celular) (Nuchsongsin *et al.*, 2007). Acredita-se que a NAC melhore a malária severa por meio da eliminação de EROs e reduza a expressão de ligantes endoteliais (Kawazu *et al.*, 2008; Nuchsongsin *et al.*, 2007).

2.2.6- O papel do NO na fisiopatologia da Malária

O óxido nítrico (NO) é uma molécula sinalizadora gasosa e lipofílica que desempenham múltiplas funções no organismo (Drew & Leeuwenburgh, 2002). O NO é libertado aquando da conversão da L-arginina da dieta a L-citrulina pela ação de isoformas de óxido nítrico sintase “NOS” (Drew & Leeuwenburgh, 2002). O NO é um neurotransmissor e regulador da pressão arterial e é um radical livre, pouco reativo. O NO é capaz de formar outros intermediários reativos de nitrogénio (nitrato, peroxinitrito e 3-nitrotirosina), que afetam a função celular (Sorriento, De Luca, Trimarco, & Iaccarino, 2018; Ozcan & Ogun, 2015). O NO reage com o O₂ por ligação ao centro binuclear do citocromo c oxidorreductase, levando à inibição da atividade do citocromo c oxidase (Cleeter *et al.*, 1994). Na mitocôndria, aumenta a produção de ERO e ERN, que afetam vários processos, como a biogénese mitocondrial, a respiração e o *stress* oxidativo (Bolisetty & Jaimes, 2013; Ozcan & Ogun, 2015).

As equações 3 e 4 representam os processos de formação e decomposição espontânea do peroxinitrito respetivamente:



O óxido nítrico é destacado neste trabalho tendo em vista o seu papel no mecanismo de defesa do hospedeiro contra uma variedade de parasitas e infeções por protozoários, incluindo o *Plasmodium* (Walker *et al.*, 2014).

Ao desencadear o estímulo imunológico e inflamatório, o NO é produzido a partir de monócitos/macrófagos pela ação enzimática do óxido nítrico sintase (Walker *et al.*, 2014).

A enzima que catalisa a produção de óxido nítrico é diferenciada com base na sua origem, ou seja, endotelial (eNOS), neuronal (nNOS) e a mais abundante é a sintase induzida do óxido nítrico (iNOS) (Nathan *et al.*, 2000).

A enzima com maior índice de produção de óxido nítrico é induzida pela iNOS (Collins *et al.* 2003) e contribui para a morte intra-hepática de parasitas em resposta a IFN- γ , TNF- α , IL-1 β e IL-6 secretados por células T específicas para antígeno e NK células (Dewasurendra *et al.*, 2012). O iNOS é uma importante enzima envolvida na regulação da expressão génica, secreção de NO e mecanismo de defesa do hospedeiro contra vários organismos infecciosos e parasitários (Hobbs *et al.*, 2002).

A produção de óxido nítrico é regulada através da indução enzimática do gene NOS e foi reportado que este gene, como fator genético do hospedeiro, contribui para a variação na frequência e intensidade do episódio clínico de malária (Dewasurendra *et al.*, 2012) e outras infecções. Vários polimorfismos do promotor NOS2 foram estudados no contexto da patologia e gravidade da malária (Hobbs *et al.*, 2002).

2.2.7- Resposta imunitária a infecção malárica no sangue

As manifestações clínicas da malária são causadas por parasitas do sangue no estágio assexuado, à medida que se reproduzem no sangue. Embora complexa e incompletamente compreendida (Miller *et al.*, 2013), geralmente aceita-se que a patogénese da malária seja motivada por dois processos distintos: sequestro e inflamação (Miller *et al.*, 2013). O sequestro envolve a ligação de iRBCs a recetores no endotélio vascular através de interações parasita-hospedeiro específicas, causando obstrução microvascular, isquemia local e inflamação no cérebro e outros órgãos vitais (Turner *et al.*, 2013). O *P. falciparum* também induz uma resposta inflamatória sistémica semelhante à sepsis bacteriana (Clark *et al.*, 2004) que pode exacerbar o sequestro de iRBC pela regulação positiva de moléculas de adesão vascular, como a ICAM-1 (Hunt & Grau, 2003). A questão fulcral é saber qual dos eventos, a inflamação ou sequestro, é o evento inicial, na patogénese da malária, (White *et al.* 2013; Clark & Alleva, 2009) mas parece provável que esses processos ocorram em paralelo e se reforcem mutuamente (Clark & Alleva, 2009).

Em áreas de transmissão intensa de *P. falciparum*, a resistência à malária grave com risco de vida é geralmente adquirida aos cinco anos de idade (Clark *et al.*, 2004). Contudo as crianças permanecem suscetíveis a episódios repetidos de malária febril, atingindo imunidade clínica quase completa na adolescência (Marsh & Kinyanjui, 2006).

Existem dois processos imunológicos que desempenham papéis cruciais no controlo de parasitas na fase sistémica do *P. falciparum* e na doença que causam: inflamação e sua regulação, e a resposta de anticorpos (Collins & Jeffery, 1999). Em indivíduos não expostos previamente, os parasitas do *P. falciparum* na fase sistémica invariavelmente induzem febre e outros sinais e sintomas de malária (Mackinnon & Read, 2004). Este processo é impulsionado pela produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas como IL-1 β , IL-6; IL-8; IL-12; (p70); IFN- γ e TNF (Day *et al.*, 1999; Walther *et al.*, 2006).

Algumas proteínas do *Plasmodium* foram identificadas como impulsionadoras da inflamação através de interações específicas com recetores do hospedeiro (Clark *et al.*, 2004). Por exemplo, determinadas proteínas como as PfEMP1s foram implicadas no sequestro de parasitas no endotélio cerebral na malária cerebral grave em crianças (Claessens *et al.*, 2012; Lavstsen *et al.*, 2012). O recetor para estas PfEMP1s foi identificado como o recetor da proteína C endotelial (EPCR) que medeia efeitos citoprotetores através da proteína C reativa sugerindo que a ligação de PfEMP1 ao EPCR pode bloquear a sua função protetora e contribuir para a patologia da malária cerebral (Turner *et al.*, 2013). A proteína de superfície merozoíta 1 (MSP1), que é expelida da superfície do merozoíto à medida que o parasita invade as RBCs,

liga-se à proteína (S100P - um membro da família de proteínas pró-inflamatórias S100) e bloqueia assim a atividade da S100P (Waisberg *et al.*, 2012). Posteriormente, verificou-se que a MSP1 se liga a todos os membros da família S100 (Waisberg *et al.*, 2012).

A inflamação induzida por *Plasmodium* provavelmente desempenha um papel importante no controlo precoce da replicação do parasita. Assim, o IFN- γ e o TNF matam os parasitas *do P. falciparum* no sangue através da produção de óxido nítrico (NO) e outros radicais tóxicos (Gun, Claser, Tan, & Rénia, 2014). Por outro lado, inflamação excessiva tem sido associada a malária grave e fatal (Grau *et al.*, 1989), que ocorre em uma minoria de indivíduos que têm pouca ou nenhuma exposição prévia à malária. No entanto, em áreas endémicas em que os indivíduos são repetidamente infetados, as infeções no estágio sanguíneo geralmente causam uma doença leve febril ou nenhum sintoma (Marsh & Kinyanjui, 2006), consistente com a hipótese de que a inflamação induzida por *Plasmodium* pode desenvolver-se. Com efeito, estudos iniciais em seres humanos mostraram que o risco de febre diminuiu com infeções experimentais em série por *Plasmodium* (Collins & Jeffery, 1999) e que a infeção por *Plasmodium* induziu tolerância cruzada à endotoxina (Omer & Riley, 1998). Consistente com esta hipótese, modelos de rato de malária não-letal mostraram que a inflamação induzida por *Plasmodium* produz (TNF e IFN- γ) 5 a 10 dias após a infeção (Omer & Riley, 1998). Em humanos, estudos transversais pareceram mostrar que proporções mais altas de citocinas pró-anti-inflamatórias ocorriam no soro durante a malária aguda e que estavam associadas a doença mais grave (Day *et al.*, 1999). Contudo verificou-se que não era uma conclusão consistente (Walther *et al.*, 2009). Também não existe uma certeza sobre os mecanismos imunoreguladores e as células que medeiam o controlo da inflamação induzida por *P. falciparum* em humanos, (Finney *et al.*, 2010; Spence *et al.*, 2012) e a duração das respostas regulatórias na ausência de exposição contínua ao *P. falciparum* (Spence *et al.*, 2012).

2.2.8- Biomarcadores Redox

Biomarcadores, ou marcadores biológicos, referem-se a qualquer entidade, substâncias, agentes químicos, células, moléculas, genes, enzimas ou hormonas mensuráveis, conseqüentemente utilizadas como parâmetros de medição e de avaliação do normal funcionamento biológico e patológico, permitindo, através da sua medição, uma previsão e detecção do início ou progressão de doenças (Maiese, 2009; Sahu *et al.*, 2011).

O (malondialdeído - MDA), é o produto da peroxidação lipídica cuja concentração pode ser usado como indicador de *stress* oxidativo, que é responsável pelo dano celular (Pereira & Martel, 2014). Os sistemas antioxidantes que neutralizam os danos dos oxidantes já foram apresentados na tabela 2. Além disso, o MDA produzido no tecido do organismo como produto da peroxidação lipídica pode ser detetado no plasma periférico (Djossou *et al.*, 1996). Assim, a detecção de MDA torna-se uma ferramenta crucial quer para a monitorização da progressão de doenças, quer para encontrar formas de elucidar os mecanismos a ele subjacentes (Antus, 2016; Chen *et al.*, 2015; Del Rio, Stewart, & Pellegrini, 2005; Khoubnasabjafari, Ansarin, & Jouyban, 2015; Shestivska *et al.*, 2015). Os níveis de biomarcadores de *stress* oxidativo de MDA correlacionam-se positivamente com infeções por *P. falciparum*, sendo os níveis de MDA significativamente maiores em indivíduos infetados pela malária (Pereira & Martel, 2014). Uma tendência similar, mas não significativa, é observada com os níveis de SOD, onde pelo contrário, não há diferença significativa entre indivíduos infetados com malária e não infetados (Pereira & Martel, 2014).

Foi verificada uma diminuição dos níveis de SOD e CAT, e um aumento nos níveis plasmáticos de MDA com hipertensão (Shantha, Sheethal, & Rashmi, 2013). Nesse estudo, a diferença nos níveis de SOD, GSH, CAT e NO entre indivíduos não infetados e infetados por malária não foi significativa, e os níveis de MDA aumentaram com a infeção por malária (Pereira & Martel, 2014). Estas conclusões estão de acordo com as observações reportadas em outro estudo sobre *stress* oxidativo e hipertensão (Szadujkis-Szadurski *et al.*, 2004). Estas observações destacam a importância dos biomarcadores redox no contexto da malária (Szadujkis-Szadurski *et al.*, 2004).

2.2.9- Quimioterapia e seu Impacto no stress oxidativo

Como foi dito no ponto 2.2.3, um dos fatores que modificam a membrana do eritrócito é o SO gerado pelo parasita. Além deste mecanismo, o SO pode ser gerado nos eritrócitos pelos próprios medicamentos utilizados para combater a doença. Isto ocorre pelo facto de o mecanismo de ação desses fármacos, em parte, utiliza EROs (Becker *et al.*, 2004). A cloroquina (CQ), Figura X, é um esquizotocida sanguíneo pertencente à classe das 4-aminoquinolinas, de baixa toxicidade nos humanos (Deharo *et al.*, 2003).

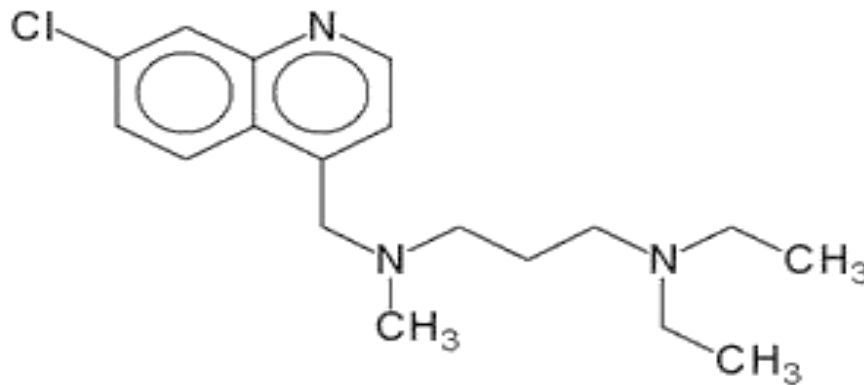


Figura 5-Estrutura da molécula de cloroquina (Müller & Hyde, 2010).

É bio transformada no fígado a monodesetilcloroquina e acumula-se nos vacúolos digestivos do *Plasmodium* em função do pH lisossómico, interferindo na metabolização e utilização da hemoglobina pelo parasita (Deharo *et al.*, 2003). A cloroquina, medicamento utilizado para eliminar as formas eritrocíticas, gera de forma secundária, SO nas hemácias (Deharo *et al.*, 2003). Esta geração ocorre pela acumulação de heme oxidado na FP resultante da ação do medicamento, que atua inibindo a enzima hemepolimerase (Deharo *et al.*, 2003; Becker *et al.*, 2004). Esta enzima utiliza a FP como substrato para gerar o pigmento malárico ou hemozoína (Deharo *et al.*, 2003; Becker *et al.*, 2004). A degradação da hemoglobina e consequente libertação de Fe^{2+} é capaz de acelerar a peroxidação lipídica, pelo aumento da geração de EROs, como o anião radical $\cdot OH$ via reação de Fenton (Bowman *et al.*, 2005). Além disso, o stress oxidativo leva à ativação dos canais de catiões (Ca^{2+}) nos eritrócitos não infetados (Koka *et al.*, 2008; Ganesan *et al.*, 2012). Uma hipótese amplamente aceite sobre o seu mecanismo de ação sugere que a ligação da cloroquina a Ferro III protoporfirina IX (Fe [III] PPIX) impede a biocristalização da hemozoína, o que resultará na formação de um composto tóxico ao *Plasmodium* (Daily, 2006). Soma-se o facto que a ferro III protoporfirina IX e/ou adutos de CQ-Fe [III] PPIX podem acarretar a formação de EROs, levando à peroxidação dos lípidos da membrana do parasita e sua consequente destruição (Montia *et al.*, 2002; Becker *et al.*,

2004; Solomon & Lee, 2009). Outros medicamentos utilizados também geram SO (Solomon & Lee, 2009). Acredita-se que a primaquina, durante o ciclo redox dos seus metabolitos, provoca um substancial SO (Solomon & Lee, 2009). Já a artemisinina, reage com moléculas de heme formando radicais citotóxicos (Becker *et al.*, 2004).

Com a finalidade de impedir os efeitos deletérios das ERONs num meio altamente oxidante, os parasitas possuem antioxidantes de baixo peso molecular, como a glutathiona, que é o mais abundante, bem como enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase e proteínas dependentes de tioredoxinas (Solomon & Lee, 2009). A estrutura e a função destas enzimas foram estudadas detalhadamente, objetivando o desenvolvimento de novos fármacos antimaláricos (Becker *et al.*, 2004).

3- Fitoterapia e o impacto sobre o stress oxidativo.

3.1- Fitoterapia anti malárica com CPG e seu impacto no stress oxidativo.

Devido às limitações associadas ao desenvolvimento de vacinas e ao programa de controlo de vetores, a gestão da malária e as complicações relacionadas estão totalmente dependentes da quimioterapia e quimioprofilaxia (Chia *et al.*, 2014).

O *Plasmodium falciparum*, o principal agente causador da doença, desenvolve decididamente a resistência contra a maioria dos antimaláricos disponíveis (Egan, 2015), despertando grande interesse pela busca de agentes bioativos especificamente eficazes contra a malária resistente (Avery, Choi, & Mukherjee, 2008). Para preservar o equilíbrio redox intracelular, o *P. falciparum* polimeriza as unidades heme livres em hemozoína. (Dhangadamajhi *et al.*, 2010). A inibição da formação de hemozoína leva à toxicidade do heme livre no parasita, que na sucessão, resulta na morte do parasita (Avery, Choi, & Mukherjee, 2008). Assim, a identificação dos inibidores da via de polimerização do heme, ou de agentes que provoquem *stress* oxidativo no parasita por qualquer meio, parece um caminho promissor para a descoberta de medicamentos para a malária (Nepveu & Turrini, 2013). Além disso, o comportamento quimiotático das moléculas livres de heme libertadas parece ser responsável pela ativação de neutrófilos do hospedeiro através de um mecanismo dependente de EROs (Porto *et al.*, 2007).

Desde a antiguidade, produtos naturais foram a fonte de medicamentos antimaláricos eficazes, como o quinino a artemisinina (Kaur *et al.*, 2009). Os glicosídeos são os principais fitoconstituintes de vários produtos fitoterápicos e, nos últimos anos, têm recebido atenção especial, como agentes antiplasmodial promissores (Moreira *et al.*, 2017).

A *Flacourtia indica* é especialmente popular entre as várias comunidades de muitos países africanos, onde é usado tradicionalmente para o tratamento da malária (Kota *et al.*, 2012). *Flacourtia indica* (Burm.f.) Merr. (*Flacourtiaceae*) é comumente conhecida como Bilangra ou "Baichi" na Índia e é tradicionalmente usado mundialmente como um remédio antimalárico à base de plantas (Kaou *et al.*, 2008; Kota *et al.*, 2012). Nas Ilhas Madagascar e Comoro, partes aéreas de *F. indica* são muito populares entre os curandeiros tradicionais para o tratamento da malária e complicações relacionadas.

Foi identificado um glicosídeo fenólico das partes aéreas de *F. indica*, como agente antiplasmodial promissor sob condições *in vitro* (Sashidhara *et al.*, 2013).

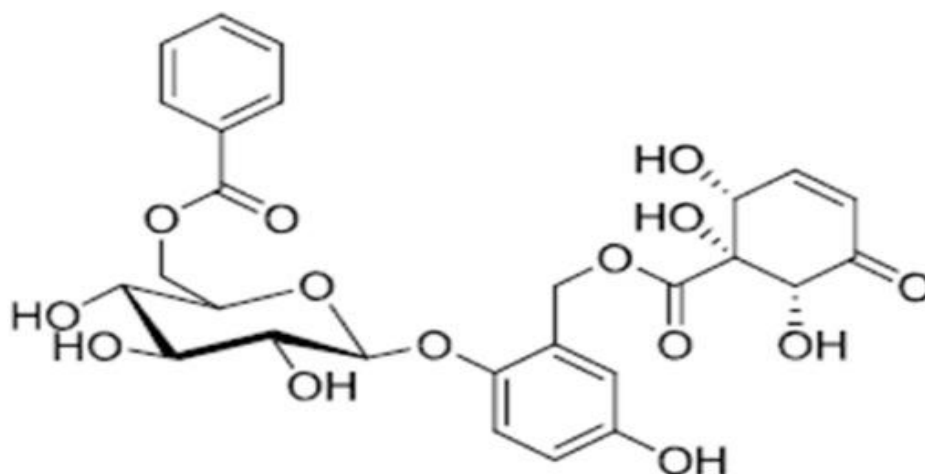


Figura 6-Estrutura do álcool 2- (6-benzoil-p-d-glucopiranosiloxi) -7-trihidroxil-3-oxociclo-hex-4-enil) -5-hidroxibenzílico (CPG).

Esta descoberta preliminar suportou a bioprospecção de uma variedade de glicosídeos isolados de plantas antimaláricas tradicionalmente usadas. Assim pretende-se atualmente proceder à identificação de produtos naturais eficazes contra a malária. Em resultado deste trabalho, um glicosídeo fenólico (CPG) utilizado como agente antiplasmodial mostrou-se promissor sob condições *in vitro* ao atrasar o desenvolvimento de parasitas (Sashidhara *et al.*, 2013), Figura 6 (CPG). Os resultados espectroscópicos *in vitro* revelaram uma forte interação de ligação entre as metades heme livres e a CPG, como também evidenciado no caso de esquizonticida sanguíneo, tais como cloroquina e amodiaquina (Gorka *et al.*, 2013). Assim, a interação seletiva entre as moléculas de heme livre e a CPG parece ser responsável pela inibição da polimerização do heme (formação de hemozoína) (Gorka *et al.*, 2013). A CPG especificamente prende o crescimento de *P. falciparum* no estágio de trofozoíto, uma fase eritrocítica do parasita da malária onde ocorre principalmente a formação de hemozoína (Ferreira *et al.*, 2008). A CPG é então considerada como um potencial inibidor da formação de hemozoína, devido a sua intervenção no crescimento de *P. falciparum* no estágio de trofozoíto (Gorka *et al.*, 2013). Além disso, verificou-se que o tratamento com CPG eleva o nível de conteúdo total de heme e empobrece o nível de hemozoína em *P. falciparum* (Ferreira *et al.*, 2008). Consequentemente, a inibição da formação de hemozoína leva à sobreposição de heme livre (ativo redox) no local de degradação, que por sua vez impõe *stress* oxidativo iniciando a sinalização redox dependente de ferro no parasita da malária (Dhangadamajhi *et al.*, 2010). Esses dados explicam o aumento do *stress* oxidativo gerado durante o tratamento com CPG que contribui positivamente para a morte do parasita.

A GSH está criticamente esgotada no parasita tratado com CPG (Becker *et al.*, 2003). Deste modo, a atividade enzimática de muitas enzimas redox, e a degradação dependente da GSH do heme livre, parece ser afetada, como evidenciado pelo nível aumentado de conteúdo total de

heme no parasita tratado. Além disso, sabe-se que a GSH desempenha um papel crucial no sistema de equilíbrio redox do parasita da malária (Becker *et al.*, 2003), de modo que o nível reduzido de GSH no parasita tratado pode ser responsável pelo início da carga oxidativa grave. Coletivamente, estes resultados sugerem que o CPG inibiu a formação de hemozoína em *P. falciparum* que, por sua vez, impõe carga oxidativa ao parasita e, portanto, retarda o seu rápido crescimento, exibindo potencial atividade antiplasmodial (Ashley *et al.*, 2014).

A eficácia anti-malárica do CPG contra *P. berghei* (estirpe sensível à cloroquina) foi avaliada em um modelo de malária em roedores (Becker *et al.*, 2003). O CPG exibiu uma quimiossupressão de parasitemia dependente da dose e prolongou a capacidade de sobrevivência dos animais tratados em comparação com os animais infetados não tratados (Ashley *et al.*, 2014). Além de uma significativa supressão da quimio, o tratamento com CPG também normalizou morbidades hematológicas alteradas (maiores níveis de hemácias e menores níveis de glóbulos brancos) nos animais tratados (Ashley *et al.*, 2014). Curiosamente, o nível de hemoglobina, hemozoína total e teor de hemozoína estimado nos animais tratados com CPG em doses mais elevadas, esteve mais próximo dos valores derivados de animais normais não infetados (Sashidhara *et al.*, 2013). Portanto, a possibilidade de inibição da formação de hemozoína em condições *in vivo* parece mais real e lógico (Ashley *et al.*, 2014).

O potencial antimalárico de um glicosídeo fenólico (CPG) isolado de partes aéreas de *F. indica* em ratinhos Swiss, inibiu eficientemente o crescimento do parasita da malária (Ashley *et al.*, 2014). O CPG é um inibidor da via metabólica heme do parasita da malária e induz o *stress* oxidativo em *P. falciparum* ((Sashidhara *et al.*, 2013). Estes resultados acrescentam evidências para o uso tradicional adequado de partes aéreas de *F. indica* por curandeiros locais em áreas endêmicas de malária e têm uma base científica bem documentada (Ashley *et al.*, 2014).

3.2- *Artemisia annua* L. (Compositae).

As drogas antimaláricas têm sido a base do controle e da profilaxia contra a malária desde o primeiro uso do quinino da árvore cinchona (Dondorp *et al.*, 2009). Muitas drogas foram desenvolvidas contra a malária no século XX, sendo as mais importantes a cloroquina e a artemisinina (Dondorp *et al.*, 2009). No entanto, a capacidade do *P. falciparum* em particular para desenvolver resistência a estes tratamentos tem ameaçado a sua eficácia contínua e aumentou a importância das combinações, bem como o desenvolvimento de novos fármacos e novos alvos (Grahame-Smith & Aronson, 2004). Estas plantas antimaláricas foram estudadas exaustivamente, e a partir delas foram isolados compostos ativos contra o *Plasmodium* (Dondorp *et al.*, 2009). É importante ressaltar que a artemisinina e o quinino foram isolados destas plantas, transformando-se nos principais agentes antimaláricos usados clinicamente, por exemplo, Artesunato, Artemeter, Aloroquina e Primaquina (Dondorp *et al.*, 2009).

3.2.1- *Artemisia annua* L. (Compositae).

A planta *Artemisia annua* (*Artemisia*) é conhecida por ser o tratamento antimalárico mais antigo, tendo sido utilizado na China há mais de 2000 anos. Contém artemisinina, uma substância que elimina os parasitas da malária mais rapidamente do que qualquer outra droga e funciona bem contra as espécies de *Plasmodium falciparum* que são resistentes a outras drogas. Esta droga produz radicais livres em contacto com o ferro, especialmente nos eritrócitos (Grahame-Smith & Aronson, 2004). Este mecanismo é extremamente eficaz no processo de destruição de parasitas e causa efeitos adversos mínimos ao hospedeiro.

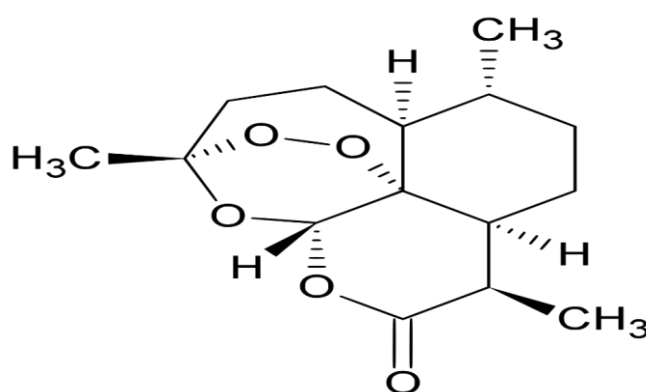


Figura 7-Estrutura da molécula de artemisinina (O'Neill *et al.*, 2010).

O tratamento com artemisinina pode proporcionar rápida recuperação e levar à eliminação de parasitas, mas o reaparecimento da parasitemia é frequente, o que pode ser explicado pela semi-vida do fármaco e a diminuição das concentrações plasmáticas após doses repetidas

(Giao *et al.*, 2001). Vários estudos demonstraram o envolvimento do *stress* oxidativo no mecanismo de ação da artemisinina (Klonis *et al.*, 2011; Giao *et al.*, 2001). O mecanismo exato de ação da artemisinina continua ainda por esclarecer, embora tenha sido postulado estar envolvido na interferência da desintoxicação do heme (Meshnick, 2002). A fração endoperoxídeo de artemisinina é clivada quando interage com o centro Fe (II) de heme livre libertado quando o parasita digere a hemoglobina no seu vacúolo alimentar, resultando na formação de radicais livres que vão alquilar alvos macromoleculares no parasita (Jambou *et al.*, 2005). Verificou-se também que a artemisinina inibe o PfATP6, o que causa o enfraquecimento do enrolamento das proteínas do parasita e a alteração da homeostase do cálcio, causando a morte parasitária (Eckstein-Ludwig *et al.*, 2003; Jambou *et al.*, 2005; O'Neill, Barton & Ward, 2010). Outros mecanismos de ação elucidados até agora incluem imunoestimulação e interferência do transporte de elétrons mitocondriais (Eckstein-Ludwig *et al.*, 2003). Neste último caso verifica-se a despolarização da membrana mitocondrial, levando ao rompimento da síntese da pirimidina, que é necessária para a produção de ácido nucleico, eventualmente resultando na morte do parasita (Golenser *et al.*, 2006).

A *A. annua* contém cerca de 600 metabolitos secundários de diversas classes químicas, predominantemente terpenóides (lactonas sesquiterpénicas, monoterpeóides, sesquiterpenóides, diterpenos, triterpenos e esteróis), fenilpropanóides, flavonóides, peptídeos, hidrocarbonetos alifáticos, álcoois alifáticos e aromáticos, aldeídos, cetonas e ácidos (Brown, 2010). O princípio mais ativo é a artemisinina sesquiterpeno endoperoxídico.

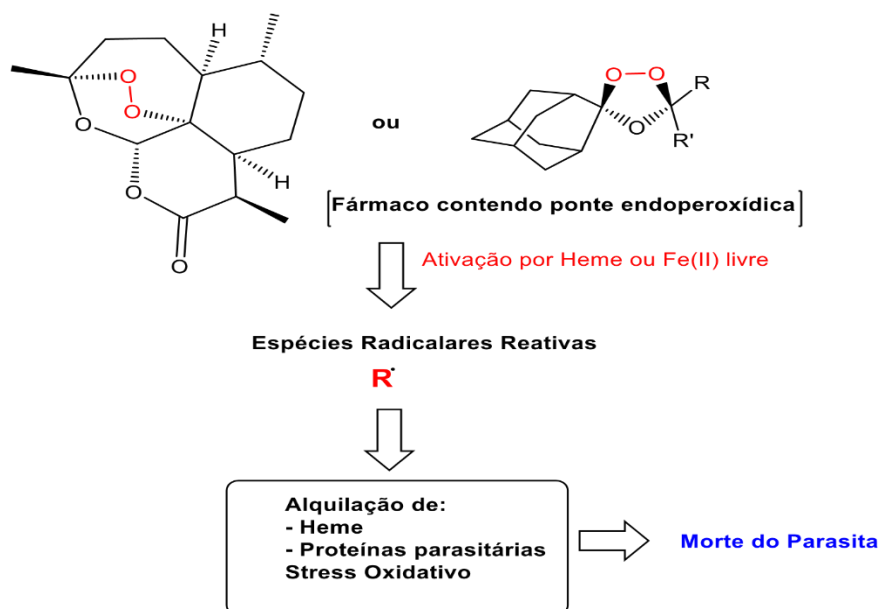


Figura 8-Representação do mecanismo e alvos de ação das espécies radiculares formadas após ativação do centro ativo endoperoxídico (França, Santos & Figueroa-Villar, 2008).

O teor de artemisinina nesta espécie varia com base na variedade a cultivar. Um estudo (Mannan *et al.*, 2010) mostrou flores que folhas e de *A. Annu*a continham a maior quantidade de artemisinina em comparação com 13 outras espécies de artemísia do Paquistão. Também foi reportado que a artemisinina está presente na parte aérea, caules e raízes da planta (Mannan *et al.*, 2010). Foi verificado que as plantas aumentaram a atividade da artemisinina *in vitro*, e algumas delas possuem atividade antipalúdica por si só, embora em menor extensão do que a artemisinina (Liu *et al.*, 1992; Willcox, 2009). Outros constituintes como a casticina e a artemitina têm efeitos sinérgicos semelhantes (Weathers & Towler, 2012). A artemisinina é relativamente não polar e, portanto, pouco solúvel em água, o que explica a sua baixa biodisponibilidade oral (aproximadamente 30%) (Titulaer *et al.*, 1990). No entanto, a biodisponibilidade da artemisinina é maior no extrato bruto do que no fármaco puro (Weathers *et al.*, 2011). A administração oral da planta inteira seca, num modelo de malária de roedores, reduziu a parasitemia de 12 a 72 horas após o tratamento em comparação à artemisinina pura. Possivelmente isto deve-se a efeitos sinérgicos entre a artemisinina e outros constituintes (por exemplo, flavonóides) na planta, atividade antimalárica individual de outros constituintes e aumento da biodisponibilidade atribuída à inibição das enzimas do citocromo intestinal e hepático P450 (CYP450) pelos flavonóides ou outros compostos presentes (Elfawal *et al.*, 2012).

As infusões de ervas foram mais comumente usadas em seis ensaios na África, onde as taxas de eliminação do parasita foram de cerca de 70% a 100%, com até 39% de taxa de recrudescimento (Willcox, 2011; Wright, 2005). Em ensaios clínicos na China, os extratos desta planta foram testados contra *P. vivax* e foram muito eficazes na eliminação da parasitemia e no alívio dos sintomas da malária, incluindo alguns casos de malária cerebral e resistentes à cloroquina (Wright, 2005). No entanto, o recrudescimento ocorreu em alguns dos pacientes 3 a 4 semanas após o tratamento com artemisina. Isto deveu-se à curta meia-vida (cerca de 2 horas) do composto (Willcox, 2011). A alta taxa de recrudescência também foi observada em um ensaio alemão, apesar de provocar uma rápida resolução dos sintomas e da parasitemia (Mueller *et al.*, 2004).

A dihidroartemisina, o metabolito ativo da artemisinina mostrou-se mais estável e eficaz do que artemisinina, com taxas mais baixas de recrudescimento (Tu, 2011). A partir da dihidroartemisina, os derivados de éter (artemeter, arteéter) e éster (artesunato) foram sintetizados para melhorar a formulação e reduzir o nível de resistência observado com o composto de origem (artemisinina) (Mueller *et al.*, 2004). Os compostos derivados têm grande importância na redução do desenvolvimento de resistência, tendo em conta a semi-vida curta da artemisinina (Tu, 2011). A artemisinina e os seus derivados não devem ser utilizados como monoterapia para a malária, mas sim em conjunto com outro agente antipalúdico. Atualmente,

as terapias combinadas à base de artemisinina (ACTs) formam o tratamento de primeira linha para a malária por *Falciparum* não complicada (incluindo em pediatria e mulheres lactantes) (Fairhurst *et al.*, 2012).

Uma porção do *P. falciparum* em fase de anel parece entrar em um estágio dormente após a exposição à artemisinina *in vitro* (Fairhurst *et al.*, 2012). Estes, sobrevivem e reproduzem-se em níveis detetáveis.

3.3-Casca da *Cinchona* (*rubiaceae*)

O quinino e a cinchonina foram isolados da casca da espécie cinchona por Pelletier e Caventou (Lee 2002). Vários extratos brutos da casca da espécie cinchona foram usados no século XX. A totaquina tipo I foi preparada dissolvendo os constituintes solúveis da casca em pó de *C. Rubaciae* em ácido clorídrico e em seguida, adicionando hidróxido de sódio para precipitar os alcalóides, que foram então secos para obter o extrato (Lee, 2002).

O quinino é um esquizonticida sanguíneo que atua no estágio maduro do trofozoíto (Lee, 2002). O seu mecanismo exato de ação não está bem elucidado, mas acredita-se que ele inibe a desintoxicação do heme Figura:7, (Lee, 2002; OMS, 2010). Sendo uma base monoprotica, acumula-se no vacúolo ácido do parasita através do aprisionamento iônico (Muller & Hyde, 2010). O composto protonado então liga-se a hemozoína no vacúolo alimentar para inibir o processo espontâneo de polimerização de hemozoína. Também é gametocitocida em *P. vivax*, *P. ovale* e *P. malariae* (Lee, 2002; OMS, 2010). A cloroquina também se acumula no vacúolo alimentar e complexos com hematina (Lee, 2002). Este complexo está envolvido no bloqueio do sequestro de heme tóxico, incorporando-se no polímero em crescimento para determinar a extensão da cadeia (Muller & Hyde, 2010).

A casca de Cinchona contém geralmente cerca de 7% a 12% de alcalóides (McCalley, 2002). O conteúdo varia com a espécie da casca usada. A *C. pubescens* contém quantidades quase iguais de cinchonina, cinchonidina, quinidina e quinina; *C. succirubra* e *C. calisaya* contém todos os quatro alcalóides; *C. ledgeriana* contém apenas quinina (embora em quantidades muito maiores) e cinchonina; *C. officinalis* contém principalmente cinchonina, cinchonidina e uma pequena quantidade de quinina; e *C. micrantha* contém cinchonina e cinchonina, mas nunca quinina (Kacprzak, 2013). A cinchonina, a cinchonidina e a quinidina são tão eficazes quanto a quinina (Borris & Schaeffer, 1992).

Os quatro alcalóides referidos no parágrafo anterior apresentam têm maior atividade juntos do que isoladamente, possivelmente por sinergia (Wesche & Black, 1990). Sete alcalóides de cinchona foram isolados de *C. succirubra* e *C. ledgeriana* pela primeira vez (Cheng *et al.*, 2014). Outros componentes não alcalóides da casca incluem taninos, chinovina, cinchona

vermelha, flavonóides e antocianósidos (Kacprzak, 2013; Rajani & Kanaki, 2008; Willcox, Bodeker & Rasoanaivo, 2005).

No século XIX, foram realizados os primeiros ensaios clínicos com quatro alcalóides: Cinchonina; cinchonidina; quinina e quinidina, em mais de 3.000 pacientes. Todos os quatro alcalóides tinham taxas de cura de 98%, com o desfecho principal de "cessação dos paroxismos febris" (Achan *et al.*, 2011). Os ensaios sobre alcalóides individuais confirmam a sua eficácia como antimaláricos. A quinidina é mais eficaz que o quinino em infecções resistentes (Achan *et al.*, 2011). Num ensaio clínico de dosagem, em que os pacientes com malária *falciparum* não tratada receberam tratamento com 400 mg ou 500 mg de uma combinação de dose fixa de quinina, quinidina e cinchonina, houve rápida resolução da parasitemia em todos os pacientes, sem recrudescência durante o período de observação, comparável ao uso de quinina sozinha (Sowunmi *et al.*, 1990). A combinação de fármacos também foi bem tolerada. Isso mostrou uma possível vantagem de se usar uma mistura de alcalóides em doses menores, ao contrário de uma dose maior de um único alcalóide (Achan *et al.*, 2011).

Os derivados sintéticos da quinina incluem a cloroquina, que é o fármaco mais seguro e barato para a malária, amodiaquina, bulaquina, mefloquina, piperaquina, primaquina e tafenoquina (Aguiar *et al.*, 2012). A maioria destes está atualmente em uso para tratamento e prevenção da malária, com a exceção da bulaquina e da tafenoquina (Aguiar *et al.*, 2012).

A resistência generalizada na maior parte do mundo, tornou a cloroquina ineficaz contra *P. falciparum*, embora ainda seja usado contra *P. vivax*, *P. ovale* e *P. malariae* (OMS, 2010). Semelhante às outras 4-aminoquinolinas, a sua prescrição não resulta em uma cura radical (Rajapakse *et al.*, 2015). Deve ser tomado em combinação com a primaquina na malária *vivax* e *ovale* sensível à cloroquina, e como monoterapia em infecções por *P. malariae* (OMS, 2010). A quinina, quando usada em combinação com clindamicina, é usada como tratamento de primeira linha da malária *falciparum* no primeiro trimestre da gravidez e como alternativa às artemisininas na malária *falciparum* grave em adultos e crianças (Rajapakse *et al.*, 2015). A quinidina é mais cardiotóxica do que a quinina e, portanto, só deve ser usada se não houver outras drogas parenterais eficazes (OMS, 2010). A amodiaquina é eficaz contra algumas cepas resistentes à cloroquina de *P. falciparum*, embora haja resistência cruzada (OMS, 2010). A mefloquina é eficaz contra todas as formas de malária (Rajapakse *et al.*, 2015).

Aprimaquina é usada na malária por *P. vivax* e *P. ovale*, juntamente com um esquizotocida para parasitas no sangue (Rajapakse *et al.*, 2015). É eficaz contra o estágio intra-hepático de todas as formas de malária e, portanto, previne recaídas (Aguiar *et al.*, 2012). A piperaquina é uma droga combinada com dihidroarteminina, utilizada como tratamento alternativo na malária *falciparum* não complicada (Rajapakse *et al.*, 2015). Tafenoquina e bulaquina visam

as formas hepáticas incluindo hipnozoítos (Aguiar *et al.*, 2012). A tafenoquina está sendo submetida a um estudo visando a cura radical da malária por *P. vivax*, enquanto a bulaquina está aprovada para uso clínico na Índia (Rajapakse *et al.*, 2015).

Os mecanismos de resistência do *P. falciparum* à cloroquina foram associados a uma maior propensão ao efluxo de cloroquina, de tal forma que existem níveis insuficientes para inibir a polimerização do heme (Rajapakse *et al.*, 2015). Não há certeza se este mecanismo ocorre com os outros derivados da quinoleína (Kabaghe *et al.*, 2016).

A cinchonina é um inibidor da glicoproteína P (P-gp). Isto tem implicações no seu uso para contornar o desenvolvimento de resistência a múltiplas drogas, bem como para drogas que são substratos da P-gp (WHO, 2010). A Cinchonina, reverteu a atividade de resistência a múltiplas drogas em malignidades linfóides recidivantes (Solary *et al.*, 2000).

3.4-Copaifera reticulata Ducke (Fabaceae) “copaíba”

A *Copaifera reticulata* Ducke (Fabaceae), conhecida como “copaíba”, encontra-se distribuída em toda a América Latina e África Ocidental (Sachetti *et al.*, 2009). A sua oleorresina é uma mistura de sesquiterpenos e diterpenos cujo principal composto é o β -cariofileno, que possui propriedades anti-inflamatórias, antibacterianas e antifúngicas (Júnior & Pinto, 2002). Outros componentes da oleorresina são β -bisaboleno (com atividades anti-inflamatória e analgésica), α -humuleno, α - e β -selineno, α -bisabolol, β -elemeno, γ -cadineno, α -cadinol etc (Júnior & Pinto, 2002). Além disso, o β -cariofileno provou ser não-tóxico para os rins, fígado ou baço em análises histopatológicas (Kamaraj *et al.*, 2014).

A oleorresina de diferentes espécies de *Copaifera* também mostrou baixa toxicidade mesmo em doses elevadas (Lee & Hufford, 1990). A ausência de características clínicas de toxicidade, ou variação de peso, é importante principalmente porque no estado de malária grave podem ser apresentados alguns sintomas pertencentes a ambos os estados, como alterações da pele, letargia e perda de peso que podem interferir nos resultados (Lee & Hufford, 1990).

As alterações fisiopatológicas induzidas pelo *Plasmodium*, dependem de vários fatores envolvidos na relação complexa entre parasita e hospedeiro (Lacerda, 2007). Assim, o estudo das complicações hepáticas, renais e hematológicas pode revelar o estado da infecção e demonstrar a ação terapêutica do tratamento (Lee & Hufford, 1990). O tratamento com oleorresina levou a um importante controle da evolução da parasitemia em animais infetados em todas as doses testadas (Lacerda, 2007). A densidade de parasitas foi inversamente correlacionada com os níveis glicêmicos. A oleorresina promoveu redução significativa dos níveis de parasitemia, contribuindo para a redução do estímulo de liberação de insulina pelo pâncreas e redução do consumo de glicose induzido pela doença, melhorando os níveis glicêmicos dos animais tratados (Lee & Hufford, 1990). Os níveis de glicose tendem a permanecer baixos durante a infecção por malária devido ao consumo de glicose pelo parasita e a alterações nas funções hepática e renal que prejudicam a gliconeogênese (Lacerda, 2007). Além disso, a fraqueza física pode influenciar os hábitos alimentares dos pacientes com malária (Lacerda, 2007). Mehta *et al.* (2006) mostraram que os eritrócitos parasitados usam cerca de 100 vezes mais glicose que os eritrócitos não parasitados e este consumo coincide com o estágio de trofozoítos do parasita, que é o período de sua maior atividade metabólica (Lee & Hufford, 1990). A redução da parasitemia pode contribuir para a manutenção dos níveis glicêmicos em animais tratados com oleorresina (Lacerda, 2007).

Estudos de alterações orgânicas ocorrendo em humanos com malária induzida por *P. falciparum* mostraram que 84% dos pacientes apresentam muitas complicações simultâneas,

como hiperparasitemia (40%) e dano hepático (36%) (Tobón Castaño et al., 2006). As infecções por *P. berguei* e *P. falciparum* causam danos semelhantes (Lacerda, 2007).

Alguns estudos demonstraram que o dano hepático pode estar relacionado com a congestão dos vasos hepáticos, infiltração periportal e dilatação sinusoidal, que promovem alterações diretas no sistema hepático, aumentando o risco de insuficiência hepática ou potenciando alterações metabólicas nos níveis glicêmicos (Marcelino et al., 2006).

Um aumento nos níveis de bilirrubina total e indireta é um indicador da insuficiência da capacidade hepática em metabolizar a bilirrubina e do aumento da hemólise promovida pelo ciclo eritrócito do parasita (Amaral et al., 2003). A capacidade da oleoresina em reduzir a parasitemia e, assim, reduzir os danos no fígado, contribuiu diretamente para o aumento da desintoxicação do fígado, reduzindo os níveis de bilirrubina total e indireta (Martelli, 2012). A redução desses parâmetros pode ter sido devido a uma redução direta da parasitemia, com a consequente redução da destruição dos eritrócitos, e isso, por sua vez, pode reduzir os níveis de bilirrubina total e indireta circulantes (Martelli, 2012).

A infecção da malária também causa danos renais devido à alta paracidemia, que é quando os eritrócitos parasitados se tornam duros, com reduzida deformabilidade e alterações na conformação (Amaral et al., 2003). Isso aumenta a viscosidade do sangue, diminuindo a microcirculação e alterando o fluxo sanguíneo renal (Martelli, 2012). Além disso, a citoaderência dos eritrócitos infetados altera a circulação local, agravando a lesão renal (Martelli, 2012). O tratamento com oleoresina reduz os níveis séricos de ureia e creatinina, sugerindo que a oleoresina pode contribuir para um aumento da microcirculação, reduzindo a citoaderência dos eritrócitos, com uma diminuição significativa da parasitemia (Amaral et al., 2003). Estas informações estão de acordo com as de Brito et al. (2005), que detetaram níveis reduzidos de ureia e creatinina em animais submetidos à síndrome de isquemia e reperfusão renal e tratados com óleo de Copaifera.

As alterações hematológicas são comuns na malária e estão intimamente relacionadas com a morbimortalidade da doença (Amaral et al., 2003). A infecção por *P. berghei* leva a um estado grave de alterações nos parâmetros hematológicos (Amaral et al., 2003). Os níveis de hemoglobina foram superiores a 14,0 g / dL nos grupos tratados com oleoresina, enquanto o grupo com malária não tratada apresentou níveis inferiores a 7,0 g / dL, que são considerados como correspondendo à anemia (Moreau et al., 2012). A anemia pode estar relacionada diretamente com a hemólise mediada pelo agente infeccioso (Moreau et al., 2012). Este agente induz um potente processo inflamatório nos eritrócitos, infetados e não infetados, contribuindo para o dano celular oxidativo e conseqüentemente para a hemólise (Amaral et

al., 2003). Além disso, a indução de apoptose também pode estar envolvida no mecanismo da anemia (Totino *et al.*, 2010).

O tratamento com oleorresina foi capaz de manter o número de hemácias semelhante ao controle, mostrando um resultado terapêutico semelhante ao do grupo tratado com artemisinina 100 mg / kg (Amaral *et al.*, 2003). O mesmo foi observado em relação à concentração de hemoglobina, mostrando a eficácia do tratamento com oleoresina no aumento dos principais parâmetros hematológicos (Totino *et al.*, 2010).

A plaquetopenia também é frequentemente observada na infecção por malária, com um número de plaquetas inferior a 180.000 / μ L (Amaral *et al.*, 2003). Na malária, a trombocitopenia está inversamente relacionada com o número de parasitas, uma vez que o tratamento com oleoresina induz um aumento no número de plaquetas (Amaral *et al.*, 2003).

A análise dos glóbulos brancos revela um alto número de leucócitos após a infecção pelo *plasmodium*, indicando uma tentativa do sistema imunológico de combater o parasita (Totino *et al.*, 2010). Nos mecanismos imunológicos envolvidos na infecção pelo *plasmodium*, o sistema imunológico do hospedeiro desenvolve uma resposta contra o parasita, alterando todos os componentes do sistema imunológico (Lamb *et al.*, 2006). A redução significativa no número de leucócitos de animais infetados com *plasmodium* tratados com oleorresina resulta na redução da resposta imunológica dos animais como consequência da redução do número de parasitas pela oleorresina (Amaral *et al.*, 2003).

A análise de animais infetados com *P. berghei* revelou que o tratamento com oleorresina ou artemisinina, promoveu um aumento no tempo de sobrevivência independentemente da dose utilizada quando comparado com animais não tratados (Lamb *et al.*, 2006). Concluiu-se que o tratamento com oleoresina é capaz de melhorar os aspectos bioquímicos e hematológicos de animais infetados com *P. berghei*, reduzindo diretamente a parasitemia (Amaral *et al.*, 2003). No entanto, mais estudos são necessários para compreender o mecanismo de ação antimalárico da oleorresina de *C. reticulata* (Lamb *et al.*, 2006).

3.5- *Flueggea virosa* e seu principal constituinte.

O surgimento global de cepas de *P. falciparum* resistentes à cloroquina tem condicionado o aumento do número de casos de malária em quase todo mundo principalmente nas regiões endêmicas (Valecha *et al.*, 2012).

Durante os estágios intra-eritrocíticos do crescimento, o *P. falciparum* consome extensivamente a hemoglobina hospedeira para seu o crescimento e, portanto, degrada-a para libertar uma grande quantidade de heme livre de atividade redox (Scholl *et al.*, 2005). Como o heme livre (ferriprotoporfirina IX) referida no ponto 2.2.5 é altamente tóxico para o parasita da malária (Becker *et al.*, 2004), ele é rapidamente transformado em hemozoína como parte do seu mecanismo de resgate. Além disso, a hemozoína atua como um agente quimiotático para a ativação de monócitos e macrófagos teciduais no hospedeiro, o que aumenta o nível de várias citocinas pró e antiinflamatórias (Moore *et al.*, 2004). Um conjunto de drogas antimaláricas, como a cloroquina, tem como alvo a via de formação da hemozoína, através da ligação direta com as partes livres do heme (Biagini *et al.*, 2003). Além disso, essas interações também promovem dano oxidativo ao parasita, inibindo fortemente a sua rápida proliferação, levando à morte do parasita (Biagini *et al.*, 2003). Portanto, a indução do *stress* oxidativo no parasita por qualquer meio é uma estratégia promissora no desenvolvimento de novas drogas antimaláricas (Moore *et al.*, 2004).

A *Flueggea virosa* é uma pequena árvore arbustiva que cresce naturalmente nas áreas rurais e tribais da Índia, bem como noutras partes do globo (Ngarivhume *et al.*, 2015). Infusões preparadas a partir das folhas são efetivamente usadas pelos profissionais de saúde tradicionais e pela comunidade indígena para tratar a malária e a febre (Ngarivhume *et al.*, 2015). Extratos brutos derivados das folhas e raízes de *F. indica* mostraram-se ativos contra o parasita da malária humana *P. falciparum* (Kaou *et al.*, 2008). Além disso, em 2007, Muthaura *et al.* Reportaram que extratos metanólicos e aquosos derivados de folhas de *F. virosa* foram capazes de inibir o crescimento do parasita da malária tanto em condições *in vitro* quanto *in vivo* em ratinhos (Muthaura *et al.*, 2007). Estudos voltados para a caracterização química de *F. virosa*, conduziram principalmente ao isolamento de terpenóides antivirais (Chao *et al.*, 2016). A bergenina isolada como principal constituinte das folhas de *F. virosa* exibiu efeito antiparasitário contra *Trypanosoma brucei* (Nyasse *et al.*, 2004). Uma vez que os extratos brutos derivados de diferentes partes de *F. virosa* demonstraram atividade anti-plasmodial promissora (Muthaura *et al.*, 2007).

Todas as frações derivadas do extrato hidro-etanólico bruto de folhas de *F. virosa* apresentaram potencial antiplasmodial *in vitro* contra a cepa sensível a cloroquina (Kaou *et al.*, 2008). Adicionalmente, o extrato e frações são não citotóxicos para macrófagos murinos

(células primárias), sendo testados em condições *in vivo* a uma dose fixa de 500 mg / kg de peso corporal, onde o extrato hidro-etanólico bruto e a fração de acetato de etilo mostraram ser mais eficazes (Kaou *et al.*, 2008). Assim, juntamente com significativa atividade antiplasmodial *in vitro*, a ação antimalárica *in vivo* do extrato hidro-etanólico bruto (80% etanol) fortalece ainda mais a alegação de seu uso global como um remédio antimalárico tradicional, onde é convencionalmente usado em infusão, para tratar a malária e complicações relacionadas (Ngarivhume *et al.*, 2015; Kaou *et al.*, 2008). Além disso, a fração de n-butanol exibiu potencial atividade antiplasmodial *in vitro*, mais não conseguiu inibir a proliferação parasitária da malária *in vivo*, o que pode ser devido à fraca absorção ou biodisponibilidade dos compostos bioativos (Ngarivhume *et al.*, 2015). A fração de acetato de etilo foi a que apresentou maior atividade (Kaou *et al.*, 2008).

O aparecimento de anemia grave durante a infecção por malária num indivíduo infetado é um incidente patológico multifatorial que contribui para a degradação das hemácias, diminuindo o conteúdo de hemoglobina e aumentando a contagem de glóbulos brancos (Mohan *et al.*, 1992). Além disso, a fração de acetato de etilo melhorou significativamente essas anomalias nos animais tratados com esta mesma fração (Kaou *et al.*, 2008). Estas observações podem ser o resultado do dano dos eritrócitos, onde a proliferação do parasita ou a inibição da via de degradação da hemoglobina (específica às proteases do parasita) parece ser a principal causa (Mohan *et al.*, 1992). Um aumento no teor total de heme e diminuição do teor de hemozoína nos animais tratados valida a hipótese de inibição da formação de hemozoína (Mohan *et al.*, 1992). Além disso, durante o evento de infecção, o sistema imunológico do hospedeiro medeia a ativação de neutrófilos para impedir o crescimento do parasita e o parasita modula o seu processo de polimerização do heme para eliminar a toxicidade do heme livre, o que facilita coletivamente a carga oxidativa do hospedeiro (Becker *et al.*, 2004; Leoratti *et al.*, 2012; Postma *et al.*, 1996) como também evidenciado pelo aumento da peroxidação lipídica sérica nos animais tratados (Becker *et al.*, 2004).

A redução significativa da peroxidação lipídica (menor nível de MDA) nos animais tratados é mais indicativa para a eficácia da fração acetato de etilo para a melhoria do *stress* oxidativo gerado durante a infecção por malária (Leoratti *et al.*, 2012). Além disso, a redução no nível sérico de MDA também pode ser devido à progressão tardia da infecção, devido a respostas imunológicas (inflamatórias e fagocíticas) moderadas do hospedeiro (Becker *et al.*, 2004). Parece provável que o alto conteúdo de antioxidantes (flavonóides e fenóis) responsável pelo potencial de eliminação de radicais livres também possa atenuar os efeitos deletérios das espécies reativas de oxigênio geradas durante a interação hospedeiro-patógeno (Leoratti *et al.*, 2012). Além disso, numa experiência de toxicidade oral aguda, a fração ativa em uma dose de 2000 mg / kg de peso corporal não exibiu nenhum sinal de toxicidade e mortalidade em

ratinhos (Becker *et al.*, 2004). Os parâmetros bioquímicos e hematológicos séricos também foram observados dentro da faixa normal e, assim, endossando novamente o seu uso tradicional contra a malária e outras doenças (Becker *et al.*, 2004).

A bergenina é considerada como um potencial inibidor da polimerização heme *in vitro*. A inibição da polimerização do heme indica as possibilidades de interação seletiva entre as moléculas de heme livre e a bergenina (Bray *et al.*, 2005). A cloroquina sendo um inibidor padrão da polimerização do heme formou complexo com heme livre libertado da degradação proteolítica da hemoglobina que finalmente leva à inibição da formação de hemozoína (Bray *et al.*, 2005). Assim, a forte afinidade de ligação da bergenina com as partes heme pode ser a possível causa para a inibição da polimerização do heme e, portanto, levando à toxicidade do heme livre no parasita da malária (Bray *et al.*, 2005; Egan, 2008). Além disso, durante o início da infecção por malária, as citocinas inflamatórias são libertadas na circulação pelos macrófagos e monócitos ativados através de um mecanismo dependente das EROs (Leoratti *et al.*, 2012; Moore *et al.*, 2004). O nível dessas citocinas depende estritamente da gravidade da doença. Deste modo, um nível baixo indica uma menor carga parasitária no hospedeiro (Moore *et al.*, 2004). Animais tratados com bergenina possuem um nível mais baixo de citocinas pró (TNF) e anti-inflamatórias (IL-6) (Leoratti *et al.*, 2012). Além disso, este dado é indicativo da eficácia da bergenina em normalizar a imunopatologia alterada do hospedeiro durante a infecção por malária, portanto, pode ser um mecanismo protetor da bergenina para prolongar a sobrevivência dos animais tratados, como observado durante a atividade antimalárica *in vivo* (Leoratti *et al.*, 2012). A identificação de constituintes minoritários adicionais presentes na fração ativa da bergenina pode esclarecer qual a sua contribuição para a atividade antimalárica observada (Bray *et al.*, 2005; Egan, 2008). Como os produtos fitoterápicos são globalmente usados e validados com segurança, o principal constituinte (bergenina) isolado das folhas de *F. virosa* parece ser um candidato promissor para o programa de descoberta de drogas antimaláricas (Leoratti *et al.*, 2012).

4-Conclusões e perspectivas futuras

O papel do *stress* oxidativo na fisiopatologia da malária é um fenômeno multifatorial e representa um aspecto importante da intrínseca, e complexa, relação parasita-hospedeiro.

A formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) é a principal responsável pela ocorrência de danos celulares no organismo. Estas espécies reativas são geralmente controladas pela presença de espécies antioxidantes, que ajudam a manter o equilíbrio do ambiente. Contudo, quando a ação das espécies antioxidantes para com as EROs já não é eficaz ocorre um desequilíbrio homeostático por aumento de espécies reativas, dando assim origem ao aparecimento de um mecanismo denominado de *stress* oxidativo. O mecanismo de *stress* oxidativo pode ser desencadeado por diversos fatores, sendo eles exógenos ou endógenos, que independentemente do tipo de fonte, vão ter uma ação prejudicial para o ser vivo. A principal ação destas espécies reativas de oxigênio consiste no ataque a diversas moléculas importantes do organismo, nomeadamente, a lípidos, proteínas e ao ácido desoxirribonucleico (DNA), que ao interferirem com estas moléculas vão comprometer o seu bom funcionamento, provocando danos graves nas células e, por conseguinte, o aparecimento de um vasto leque de patologias incluindo a malária. De modo a perceber o mecanismo de ação das EROs é necessário recorrer a metodologias analíticas e amostras biológicas específicas para efetuar a sua deteção e análise. Porém, devido à instabilidade e reatividade característica destas espécies, torna-se difícil a sua medição e, conseqüentemente, a perceção da extensão do dano oxidativo causado. Assim, a utilização de biomarcadores de *stress* oxidativo torna-se uma opção viável para contornar o problema de análise das espécies reativas de oxigênio, uma vez que estes marcadores biológicos são moléculas mais estáveis, específicas e sensíveis com a capacidade de serem mensuráveis, e desse modo úteis para quantificar o *stress* oxidativo no organismo. Portanto, estudos mais profundos sobre os sistemas redox do parasita será também uma estratégia, efetiva e realista, para desenvolver fármacos antimaláricos.

A abordagem realizada sobre as plantas medicinais usadas para o tratamento da malária, apesar de todas as suas propriedades com potencial terapêutico são necessários mais estudos para que se consigam pesquisar novos compostos de origem vegetal com potencial para evitar a progressão do parasita da malária. Esta ação pode constituir uma estratégia antimalárica adjuvante muito mais eficaz que cause menos danos ao hospedeiro.

5-Referências Bibliográficas

- Achan, J., Talisuna, A. O., Erhart, A., Yeka, A., Tibenderana, J. K., Baliraine, F. N., ... D'Alessandro, U. (2011). Quinine, an old anti-malarial drug in a modern world: role in the treatment of malaria. *Malaria Journal*, 10(1), 144.
- Aguiar, A. C. C., da Rocha, E. M. M., de Souza, N. B., França, T. C. C., & Krettli, A. U. (2012). New approaches in antimalarial drug discovery and development: a review. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 107(7), 831–845.
- Aguilar, R., Magallon-Tejada, A., Achtman, A. H., Moraleda, C., Joice, R., Cisteró, P., ... Mueller, I. (2013). Molecular evidence for the localization of Plasmodium falciparum immature gametocytes in the bone marrow. *Blood*, blood-2013.
- Almeida, B. F. M. de. (2013). Estresse oxidativo na leishmaniose visceral canina.
- Amaral, C. N. do, Albuquerque, Y. D. de, Pinto, A. Y. N., & Souza, J. M. de. (2003). A importância do perfil clínico-laboratorial no diagnóstico diferencial entre malária e hepatite aguda viral. *J Pediatr (Rio J)*, 79(5), 429–434.
- Antus, B. (2016). Oxidative stress markers in sputum. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016.
- Ashley, E. A., Dhorda, M., Fairhurst, R. M., Amaratunga, C., Lim, P., Suon, S., ... Sam, B. (2014). Spread of artemisinin resistance in Plasmodium falciparum malaria. *New England Journal of Medicine*, 371(5), 411–423.
- Avery, M. A., Choi, S.-R., & Mukherjee, P. (2008). The fight against drug-resistant malaria: novel plasmodial targets and antimalarial drugs. *Current Medicinal Chemistry*, 15(2), 161–171.
- Bandyopadhyay, U., & Dey, S. (2011). Antimalarial drugs and molecules inhibiting hemozoin formation. *Apicomplexan Parasites: Molecular Approaches toward Targeted Drug Development*, 205–234.
- Barbosa, K. B. F., Costa, N. M. B., Alfenas, R. de C. G., De Paula, S. O., Minim, V. P. R., & Bressan, J. (2010). Estresse oxidativo; conceito, implicações e fatores modulatórios Oxidative stress; concept, implications and modulating factors. *Revista de Nutrição*, 23(4), 629–643.
- Becker, K., Tilley, L., Vennerstrom, J. L., Roberts, D., Rogerson, S., & Ginsburg, H. (2004). Oxidative stress in malaria parasite-infected erythrocytes: host–parasite interactions. *International Journal for Parasitology*, 34(2), 163–189.
- Becker, N., Petrić, D., Boase, C., Lane, J., Zgomba, M., Dahl, C., & Kaiser, A. (2003). *Mosquitoes and their control* (Vol. 2). Springer.
- Bhattacharyya, A., Chattopadhyay, R., Mitra, S., & Crowe, S. E. (2014). Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. *Physiological Reviews*, 94(2), 329–354.
- Biagini, G. A., Richier, E., Bray, P. G., Calas, M., Vial, H., & Ward, S. A. (2003). Heme binding contributes to antimalarial activity of bis-quaternary ammoniums. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(8), 2584–2589.
- Bolisetty, S., & Jaimes, E. A. (2013). Mitochondria and reactive oxygen species: physiology and pathophysiology. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(3), 6306–6344.

- Borris, R. P., & Schaeffer, J. M. (1992). Antiparasitic agents from plants. In *Phytochemical Resources for medicine and Agriculture* (pp. 117–158). Springer.
- Bousema, T., Dinglasan, R. R., Morlais, I., Gouagna, L. C., van Warmerdam, T., Awono-Ambene, P. H., ... Tchuinkam, T. (2012). Mosquito feeding assays to determine the infectiousness of naturally infected *Plasmodium falciparum* gametocyte carriers. *PloS One*, 7(8), e42821.
- Bowman, Z. S., Morrow, J. D., Jollow, D. J., & McMillan, D. C. (2005). Primaquine-induced hemolytic anemia: role of membrane lipid peroxidation and cytoskeletal protein alterations in the hemotoxicity of 5-hydroxyprimaquine. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 314(2), 838–845.
- Bray, P. G., Ward, S. A., & O’neill, P. M. (2005). Quinolines and artemisinin: chemistry, biology and history. In *Malaria: drugs, disease and post-genomic biology* (pp. 3–38). Springer.
- Brito, M. V. H., Moreira, R. de J., Tavares, M. L. C., Carballo, M. C. S., Carneiro, T. X., & Santos, A. de A. S. dos. (2005). Efeito do óleo de copaíba nos níveis séricos de uréia e creatinina em ratos submetidos à síndrome de isquemia e reperfusão renal. *Acta Cir. Bras*, 20(3), 243–246.
- Brown, G. D. (2010). The biosynthesis of artemisinin (Qinghaosu) and the phytochemistry of *Artemisia annua* L.(Qinghao). *Molecules*, 15(11), 7603–7698.
- Brunet, L. R. (2001). Nitric oxide in parasitic infections. *International Immunopharmacology*, 1(8), 1457–1467.
- Caulfield, L. E., Richard, S. A., & Black, R. E. (2004). Undernutrition as an underlying cause of malaria morbidity and mortality in children less than five years old. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 71(2_suppl), 55–63
- Centers for Disease Control and Prevention. Dengue. [Acessado em 31 jan. 2010.] Disponível em: <<http://www.cdc.gov/dengue/>>.
- Chao, C.-H., Cheng, J.-C., Shen, D.-Y., Huang, H.-C., Wu, Y.-C., & Wu, T.-S. (2016). Terpenoids from *Flueggea virosa* and their anti-hepatitis C virus activity. *Phytochemistry*, 128, 60–70.
- Chen, J., Zeng, L., Xia, T., Li, S., Yan, T., Wu, S., ... Liu, Z. (2015). Toward a biomarker of oxidative stress: a fluorescent probe for exogenous and endogenous malondialdehyde in living cells. *Analytical Chemistry*, 87(16), 8052–8056.
- Cheng, G.-G., Cai, X.-H., Zhang, B.-H., Li, Y., Gu, J., Bao, M.-F., ... Luo, X.-D. (2014). Cinchona alkaloids from *Cinchona succirubra* and *Cinchona ledgeriana*. *Planta Medica*, 80(02/03), 223–230.
- Chia, W. N., Goh, Y. S., & Rénia, L. (2014). Novel approaches to identify protective malaria vaccine candidates. *Frontiers in Microbiology*, 5, 586.
- Churcher, T. S., Bousema, T., Walker, M., Drakeley, C., Schneider, P., Ouédraogo, A. L., & Basáñez, M.-G. (2013). Predicting mosquito infection from *Plasmodium falciparum* gametocyte density and estimating the reservoir of infection. *Elife*, 2, e00626.
- Claessens, A., Adams, Y., Ghumra, A., Lindergard, G., Buchan, C. C., Andisi, C., ... Wang, C. W. (2012). A subset of group A-like var genes encodes the malaria parasite ligands for binding to human brain endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(26), E1772–E1781.

- Clark, I. A., & Alleva, L. M. (2009). Is human malarial coma caused, or merely deepened, by sequestration? *Trends in Parasitology*, *25*(7), 314–318.
- Clark, I. A., Alleva, L. M., Mills, A. C., & Cowden, W. B. (2004). Pathogenesis of malaria and clinically similar conditions. *Clinical Microbiology Reviews*, *17*(3), 509–539.
- Cleeter, M. W. J., Cooper, J. M., Darley-Usmar, V. M., Moncada and, S., & Schapira, A. H. V. (1994). Reversible inhibition of cytochrome c oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide. *FEBS Letters*, *345*(1), 50–54.
- Collins, J. L., Vodovotz, Y., Hierholzer, C., Villavicencio, R. T., Liu, S., Alber, S., ... Godfrey, A. (2003). Characterization of the expression of inducible nitric oxide synthase in rat and human liver during hemorrhagic shock. *Shock*, *19*(2), 117–122.
- Collins, W. E., & Jeffery, G. M. (1999). A retrospective examination of the patterns of recrudescence in patients infected with *Plasmodium falciparum*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *61*(1_Supplement), 44–48.
- Combrinck, J. M., Joanne, E., Hearne, G. R., Marques, H. M., Ntenti, S., Sewell, B. T., ... Walden, J. C. (2002). Fate of haem iron in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Biochemical Journal*, *365*(2), 343–347.
- Costa, A. de P., Bressan, C. da S., Pedro, R. S., Souza, R. V. de, Silva, S. da, Souza, P. R. de, ... Brasil, P. (2010). Diagnóstico tardio de malária em área endêmica de dengue na extra-Amazônia brasileira: experiência recente de uma unidade sentinela no Estado do Rio de Janeiro.
- Cox-Singh, J., Davis, T. M. E., Lee, K.-S., Shamsul, S. S. G., Matusop, A., Ratnam, S., ... Singh, B. (2008). *Plasmodium knowlesi* malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening. *Clinical Infectious Diseases*, *46*(2), 165–171.
- Daily, J. P. (2006). Antimalarial drug therapy: the role of parasite biology and drug resistance. *The Journal of Clinical Pharmacology*, *46*(12), 1487–1497.
- Day, N. P. J., Hien, T. T., Schollaardt, T., Loc, P. P., Chuong, L. Van, Hong Chau, T. T., ... White, N. J. (1999). The prognostic and pathophysiologic role of pro- and anti-inflammatory cytokines in severe malaria. *The Journal of Infectious Diseases*, *180*(4), 1288–1297.
- de Souza Leoratti, F. M., Trevelin, S. C., Cunha, F. Q., Rocha, B. C., Costa, P. A. C., Gravina, H. D., ... & Gazzinelli, R. T. (2012). Neutrophil paralysis in *Plasmodium vivax* malaria. *PLoS neglected tropical diseases*, *6*(6), e17110.
- Deharo, E., Barkan, D., Krugliak, M., Golenser, J., & Ginsburg, H. (2003). Potentiation of the antimalarial action of chloroquine in rodent malaria by drugs known to reduce cellular glutathione levels. *Biochemical Pharmacology*, *66*(5), 809–817.
- Del Rio, D., Stewart, A. J., & Pellegrini, N. (2005). A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, *15*(4), 316–328.
- Dembélé, L., Franetich, J.-F., Lorthiois, A., Gego, A., Zeeman, A.-M., Kocken, C. H. M., ... Sauerwein, R. (2014). Persistence and activation of malaria hypnozoites in long-term primary hepatocyte cultures. *Nature Medicine*, *20*(3), 307.
- Dewasurendra, R. L., Suriyaphol, P., Fernando, S. D., Carter, R., Rockett, K., Corran, P., ... Karunaweera, N. D. (2012). Genetic polymorphisms associated with anti-malarial antibody

levels in a low and unstable malaria transmission area in southern Sri Lanka. *Malaria Journal*, 11(1), 281.

Dey, S., Guha, M., Alam, A., Goyal, M., Bindu, S., Pal, C., ... Bandyopadhyay, U. (2009). Malarial infection develops mitochondrial pathology and mitochondrial oxidative stress to promote hepatocyte apoptosis. *Free Radical Biology and Medicine*, 46(2), 271–281.

Dhangadamajhi, G., Kar, S. K., & Ranjit, M. (2010). The survival strategies of malaria parasite in the red blood cell and host cell polymorphisms. *Malaria Research and Treatment*, 2010.

Di Meo, S., Reed, T. T., Venditti, P., & Victor, V. M. (2016). Role of ROS and RNS sources in physiological and pathological conditions. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016.

Djossou, P. F., Receveur, M. C., Peuchant, E., Monlun, E., Clerc, M., Longy-Boursier, M., & Le, M. B. (1996). Oxidative stress and malaria. Apropos of 24 cases of Plasmodium falciparum malaria. *Bulletin de La Societe de Pathologie Exotique (1990)*, 89(1), 17–23.

Dondorp, A. M., Nosten, F., Yi, P., Das, D., Physo, A. P., Tarning, J., ... Lee, S. J. (2009). Artemisinin resistance in Plasmodium falciparum malaria. *New England Journal of Medicine*, 361(5), 455–467.

Drew, B., & Leeuwenburgh, C. (2002). Aging and the role of reactive nitrogen species. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 959(1), 66–81.

Dumaswala, U. J., Zhuo, L., Mahajan, S., Nair, P. N. M., Shertzer, H. G., Dibello, P., & Jacobsen, D. W. (2001). Glutathione protects chemokine-scavenging and antioxidative defense functions in human RBCs. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 280(4), C867–C873.

Eckstein-Ludwig, U., Webb, R. J., Van Goethem, I. D. A., East, J. M., Lee, A. G., Kimura, M., ... Krishna, S. (2003). Artemisinins target the SERCA of Plasmodium falciparum. *Nature*, 424(6951), 957.

Egan, T. J. (2008). Recent advances in understanding the mechanism of hemozoin (malaria pigment) formation. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 102(5–6), 1288–1299.

Egan, T. J. (2015). Drug-resistant Plasmodium falciparum: are recent advances a cause for optimism? *Future Microbiology*, 10(8), 1261–1263.

Elfawal, M. A., Towler, M. J., Reich, N. G., Golenbock, D., Weathers, P. J., & Rich, S. M. (2012). Dried whole plant Artemisia annua as an antimalarial therapy. *PLoS One*, 7(12), e52746.

Fairhurst, R. M., Nayyar, G. M. L., Breman, J. G., Hallett, R., Vennerstrom, J. L., Duong, S., ... Dondorp, A. M. (2012). Artemisinin-resistant malaria: research challenges, opportunities, and public health implications. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 87(2), 231–241.

Famin, O., Krugliak, M., & Ginsburg, H. (1999). Kinetics of inhibition of glutathione-mediated degradation of ferriprotoporphyrin IX by antimalarial drugs. *Biochemical Pharmacology*, 58(1), 59–68.

Farfour, E., Charlotte, F., Settegrana, C., Miyara, M., & Buffet, P. (2012). The extravascular compartment of the bone marrow: a niche for Plasmodium falciparum gametocyte maturation? *Malaria Journal*, 11(1), 285.

Ferreira, A., Balla, J., Jeney, V., Balla, G., & Soares, M. P. (2008). A central role for free heme in the pathogenesis of severe malaria: the missing link? *Journal of Molecular Medicine*,

86(10), 1097–1111.

Ferreira, I. C. F. R., & Abreu, R. (2007). Stress oxidativo, antioxidantes e fitoquímicos. *Bioanálise*, 32–39.

Figueiredo, R. T., Fernandez, P. L., Morao-Sa, D. S., Porto, B. N., Dutra, F. F., Alves, L. S., ... Bozza, M. T. (2007). Characterization of heme as activator of Toll-like receptor 4. *Journal of Biological Chemistry*.

Finney, O. C., Riley, E. M., & Walther, M. (2010). Regulatory T cells in malaria – friend or foe? *Trends in Immunology*, 31(2), 63–70.

Foth, B. J., Zhang, N., Chahal, B. K., Sze, S. K., Preiser, P. R., & Bozdech, Z. (2011). Quantitative time-course profiling of parasite and host cell proteins in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Molecular & Cellular Proteomics*, mcp-M110.

França, T. C. C., Santos, M. G. dos, & Figueroa-Villar, J. D. (2008). Malária: aspectos históricos e quimioterapia. *Quim Nova*, 31(5), 1271–1278.

Ganesan, S., Chaurasiya, N. D., Sahu, R., Walker, L. A., & Tekwani, B. L. (2012). Understanding the mechanisms for metabolism-linked hemolytic toxicity of primaquine against glucose 6-phosphate dehydrogenase deficient human erythrocytes: evaluation of eryptotic pathway. *Toxicology*, 294(1), 54–60.

Giao, P. T., Binh, T. Q., Kager, P. A., Long, H. P., Van Thang, N., Van Nam, N., & de Vries, P. J. (2001). Artemisinin for treatment of uncomplicated falciparum malaria: is there a place for monotherapy? *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 65(6), 690–695.

Golenser, J., Waknine, J. H., Krugliak, M., Hunt, N. H., & Grau, G. E. (2006). Current perspectives on the mechanism of action of artemisinins. *International Journal for Parasitology*, 36(14), 1427–1441.

Gomes, B. A. Q. (2011). Efeitos da suplementação com antioxidantes sobre as alterações oxidativas cerebrais e pulmonares em malária murina.

Gorka, A. P., de Dios, A., & Roepe, P. D. (2013). Quinoline drug–heme interactions and implications for antimalarial cytostatic versus cytotoxic activities. *Journal of Medicinal Chemistry*, 56(13), 5231–5246.

Gottlieb, M. G. V., da Cruz, I. B. M., Schwanke, C. H. A., & Bodanese, L. C. (2010). Estresse oxidativo como fator de risco cardiometabólico emergente. *Scientia Medica*, 20(3).

Grahame-Smith, D. G. (2004). *Tratado de farmacologia clínica e farmacoterapia*. Guanabara-Koogan.

Grau, G. E., Taylor, T. E., Molyneux, M. E., Wirima, J. J., Vassalli, P., Hommel, M., & Lambert, P.-H. (1989). Tumor necrosis factor and disease severity in children with falciparum malaria. *New England Journal of Medicine*, 320(24), 1586–1591.

Greenwood, B. M., Fidock, D. A., Kyle, D. E., Kappe, S. H. I., Alonso, P. L., Collins, F. H., & Duffy, P. E. (2008). Malaria: progress, perils, and prospects for eradication. *The Journal of Clinical Investigation*, 118(4), 1266–1276.

Greve, B., Lehman, L. G., Lell, B., Luckner, D., Schmidt-Ott, R., & Kremsner, P. G. (1999). High oxygen radical production is associated with fast parasite clearance in children with *Plasmodium falciparum* malaria. *The Journal of Infectious Diseases*, 179(6), 1584–1586.

Gun, S. Y., Claser, C., Tan, K. S. W., & Rénia, L. (2014). Interferons and interferon regulatory factors in malaria. *Mediators of Inflammation*, 2014.

Günther, Svenja, Janet Storm, and Sylke Müller. "Plasmodium falciparum: organelle-specific acquisition of lipoic acid." *The international journal of biochemistry & cell biology* 41.4 (2009): 748-752.

Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (2015). *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, USA.

Hassan, G. I., Gregory, U., & Maryam, H. (2004). Serum ascorbic acid concentration in patients with acute Falciparum malaria infection: possible significance. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 8(5), 378–381.

Haynes, R. K., & Krishna, S. (2004). Artemisinins: activities and actions. *Microbes and Infection*, 6(14), 1339–1346.

Hobbs, M. R., Udhayakumar, V., Levesque, M. C., Booth, J., Roberts, J. M., Tkachuk, A. N., ... Nahlen, B. L. (2002). A new NOS2 promoter polymorphism associated with increased nitric oxide production and protection from severe malaria in Tanzanian and Kenyan children. *The Lancet*, 360(9344), 1468–1475.

Hunt, N. H., & Grau, G. E. (2003). Cytokines: accelerators and brakes in the pathogenesis of cerebral malaria. *Trends in Immunology*, 24(9), 491–499.

Jacobson, J. M., Lalezari, J. P., Thompson, M. A., Fichtenbaum, C. J., Saag, M. S., Zingman, B. S., ... Marozsan, A. J. (2010). Phase 2a study of the CCR5 monoclonal antibody PRO 140 administered intravenously to HIV-infected adults. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(10), 4137–4142.

Jambou, R., Legrand, E., Niang, M., Khim, N., Lim, P., Volney, B., ... Fandeur, T. (2005). Resistance of Plasmodium falciparum field isolates to in-vitro artemether and point mutations of the SERCA-type PfATPase6. *The Lancet*, 366(9501), 1960–1963.

Jaramillo, M., Godbout, M., & Olivier, M. (2005). Hemozoin induces macrophage chemokine expression through oxidative stress-dependent and-independent mechanisms. *The Journal of Immunology*, 174(1), 475–484.

Joice, R., Nilsson, S. K., Montgomery, J., Dankwa, S., Egan, E., Morahan, B., ... Williamson, K. C. (2014). Plasmodium falciparum transmission stages accumulate in the human bone marrow. *Science Translational Medicine*, 6(244), 244re5-244re5.

Jortzik, E., Mailu, B. M., Preuss, J., Fischer, M., Bode, L., Rahlfs, S., & Becker, K. (2011). Glucose-6-phosphate dehydrogenase-6-phosphogluconolactonase: a unique bifunctional enzyme from Plasmodium falciparum. *Biochemical Journal*, 436(3), 641–650.

Junior, V. V., & Pinto, A. C. (2002). O GÊNERO Copaifera L. *Quim. Nova*, 25(2), 273-286.

Kabaghe, A. N., Visser, B. J., Spijker, R., Phiri, K. S., Grobusch, M. P., & Vugt, M. (2016). Health workers' compliance to rapid diagnostic tests (RDTs) to guide malaria treatment: a systematic review and meta-analysis. *Malaria Journal*, 15(1), 163.

Kacprzak, K. M. (2013). Chemistry and biology of Cinchona alkaloids. In *Natural Products* (pp. 605–641). Springer.

Kamaraj, C., Rahuman, A. A., Roopan, S. M., Bagavan, A., Elango, G., Zahir, A. A., ...

- Marimuthu, S. (2014). Bioassay-guided isolation and characterization of active antiplasmodial compounds from *Murraya koenigii* extracts against *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium berghei*. *Parasitology Research*, *113*(5), 1657–1672.
- Kaou, A. M., Mahiou-Leddet, V., Hutter, S., Aïnouddine, S., Hassani, S., Yahaya, I., ... Ollivier, E. (2008). Antimalarial activity of crude extracts from nine African medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, *116*(1), 74–83.
- Kaur, K., Jain, M., Kaur, T., & Jain, R. (2009). Antimalarials from nature. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, *17*(9), 3229–3256.
- Kavishe, R. A., Koenderink, J. B., McCall, M. B. B., Peters, W. H. M., Mulder, B., Hermsen, C. C., ... Van Der Ven, A. J. A. M. (2006). Severe *Plasmodium falciparum* malaria in Cameroon: associated with the glutathione S-transferase M1 null genotype. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *75*(5), 827–829.
- Kawazu, S., Komaki-Yasuda, K., Oku, H., & Kano, S. (2008). Peroxiredoxins in malaria parasites: parasitologic aspects. *Parasitology International*, *57*(1), 1–7.
- Keller, C. C., Kreamsner, P. G., Hittner, J. B., Misukonis, M. A., Weinberg, J. B., & Perkins, D. J. (2004). Elevated nitric oxide production in children with malarial anemia: hemozoin-induced nitric oxide synthase type 2 transcripts and nitric oxide in blood mononuclear cells. *Infection and Immunity*, *72*(8), 4868–4873.
- Kharazmi, A., Jepsen, S., & Andersen, B. J. (1987). Generation of reactive oxygen radicals by human phagocytic cells activated by *Plasmodium falciparum*. *Scandinavian Journal of Immunology*, *25*(4), 335–341.
- Khoubnasabjafari, M., Ansarin, K., & Jouyban, A. (2015). Reliability of malondialdehyde as a biomarker of oxidative stress in psychological disorders. *BioImpacts: BI*, *5*(3), 123.
- Klonis, N., Crespo-Ortiz, M. P., Bottova, I., Abu-Bakar, N., Kenny, S., Rosenthal, P. J., & Tilley, L. (2011). Artemisinin activity against *Plasmodium falciparum* requires hemoglobin uptake and digestion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(28), 11405–11410.
- Koka, S., Lang, C., Boini, K. M., Bobbala, D., Huber, S., & Lang, F. (2008). Influence of chlorpromazine on eryptosis, parasitemia and survival of *Plasmodium berghei* infected mice. *Cellular Physiology and Biochemistry*, *22*(1–4), 261–268.
- Kota, G. C., Karthikeyan, M., & Kannan, M. (2012). Rajasekar: *Flacourtia indica* (Burm. f.) Merr.: a phytopharmacological review. *Int J Res Pharmaceut Biomed Sci*, *3*(1), 78–81.
- Kreamsner, P. G., Winkler, S., Brandts, C., Wildling, E., Jenne, L., Graninger, W., ... Grau, G. E. (1995). Prediction of accelerated cure in *Plasmodium falciparum* malaria by the elevated capacity of tumor necrosis factor production. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *53*(5), 532–538.
- Kumar, A. (2006). Thrombocytopenia--an indicator of acute vivax malaria. *Indian Journal of Pathology & Microbiology*, *49*(4), 505–508.
- Lacerda, M. V. G. de. (2007). Manifestações clínicas e patogênese da plaquetopenia na malária.
- Lamb, T. J., Brown, D. E., Potocnik, A. J., & Langhorne, J. (2006). Insights into the immunopathogenesis of malaria using mouse models. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, *8*(6), 1–22.

- Lavstsen, T., Turner, L., Saguti, F., Magistrado, P., Rask, T. S., Jespersen, J. S., ... Marquard, A. M. (2012). Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 domain cassettes 8 and 13 are associated with severe malaria in children. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(26), E1791–E1800.
- Lee, I.-S., & Hufford, C. D. (1990). Metabolism of antimalarial sesquiterpene lactones. *Pharmacology & Therapeutics*, 48(3), 345–355.
- Lee, M. R. (2002). Plants against malaria. Part 1: Cinchona or the Peruvian bark. *The Journal of the Royal College of Physicians of Edinburgh*, 32(3), 189–196.
- Liu, K. C.-S. C., Yang, S.-L., Roberts, M. F., Elford, B. C., & Phillipson, J. D. (1992). Antimalarial activity of Artemisia annua flavonoids from whole plants and cell cultures. *Plant Cell Reports*, 11(12), 637–640.
- Lushchak, V. I. (2014). Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-Biological Interactions*, 224, 164–175.
- Mackinnon, M. J., & Read, A. F. (2004). Virulence in malaria: an evolutionary viewpoint. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 359(1446), 965–986.
- Maiese, K. (2009). Marking the onset of oxidative stress: biomarkers and novel strategies. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2(1), 1.
- Mannan, A., Ahmed, I., Arshad, W., Asim, M. F., Qureshi, R. A., Hussain, I., & Mirza, B. (2010). Survey of artemisinin production by diverse Artemisia species in northern Pakistan. *Malaria Journal*, 9(1), 310.
- Marcelino, P., Borba, A., Fernandes, A. P., Marum, S., Germano, N., & Lopes, M. G. (2006). Non invasive evaluation of central venous pressure using echocardiography in the intensive care—Specific features of patients with right ventricular enlargement and chronic exacerbated pulmonary disease. *Revista Portuguesa de Pneumologia (English Edition)*, 12(6), 637–658.
- Marsh, K. and, & Kinyanjui, S. (2006). Immune effector mechanisms in malaria. *Parasite Immunology*, 28(1- 2), 51–60.
- Martelli, A. (2012). Síntese e metabolismo da bilirrubina e fisiopatologia da hiperbilirrubinemia associados à Síndrome de Gilbert: revisão de literatura. *Revista Médica de Minas Gerais-rmmg*, 22(2).
- McCalley, D. V. (2002). Analysis of the Cinchona alkaloids by high-performance liquid chromatography and other separation techniques. *Journal of Chromatography A*, 967(1), 1–19.
- Megnekou, R., Djontu, J. C., Bigoga, J. D., Medou, F. M., Tenou, S., & Lissom, A. (2015). Impact of placental Plasmodium falciparum malaria on the profile of some oxidative stress biomarkers in women living in Yaoundé, Cameroon. *PloS One*, 10(8), e0134633.
- Mehta, M., Sonawat, H. M., & Sharma, S. (2006). Glycolysis in Plasmodium falciparum results in modulation of host enzyme activities. *Journal of Vector Borne Diseases*, 43(3), 95.
- Mello, A. G. N. C. (2012). Marcadores de estresse oxidativo em pacientes com malária por Plasmodium vivax, durante o tratamento com primaquina e cloroquina.
- Meshnick, S. R. (2002). Artemisinin: mechanisms of action, resistance and toxicity.

International Journal for Parasitology, 32(13), 1655–1660.

Miller, L. H., Ackerman, H. C., Su, X., & Wellems, T. E. (2013). Malaria biology and disease pathogenesis: insights for new treatments. *Nature Medicine*, 19(2), 156.

Miller, S. K., Good, R., Drew, D. R., Delorenzi, M., Sanders, P. R., Hodder, A. N., ... Crabb, B. S. (2002). A subset of *Plasmodium falciparum* SERA genes are expressed and appear to play an important role in the erythrocytic cycle. *Journal of Biological Chemistry*.

Ministério da Saúde de Angola. (2015). Indicadores de Saúde e Estatísticas Vitais.

Ministério da Saúde. (2011). Inquérito de indicadores de malária. Luanda, Angola.

Mohan, K., Ganguly, N. K., Dubey, M. L., & Mahajan, R. C. (1992). Oxidative damage of erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum*. *Annals of Hematology*, 65(3), 131–134.

Monti, D., Basílico, N., Parapini, S., Pasini, E., Olliaro, P., & Taramelli, D. (2002). Does chloroquine really act through oxidative stress? *FEBS Letters*, 522(1–3), 3–5.

Moore, J. M., Chaisavaneeyakorn, S., Perkins, D. J., Othoro, C., Otieno, J., Nahlen, B. L., ... Udhayakumar, V. (2004). Hemozoin differentially regulates proinflammatory cytokine production in human immunodeficiency virus-seropositive and-seronegative women with placental malaria. *Infection and Immunity*, 72(12), 7022–7029.

Moreau, R., Malu, D. T., Dumais, M., Dalko, E., Gaudreault, V., Roméro, H., ... Dodd, E. L. (2012). Alterations in bone and erythropoiesis in hemolytic anemia: comparative study in bled, phenylhydrazine-treated and *Plasmodium*-infected mice. *PLoS One*, 7(9), e46101.

Moreira, E. T. de S. (2017). Estudo do Efeito da Minociclina no Dano Cognitivo Associado a Malária Cerebral.

Mueller, M. S., Runyambo, N., Wagner, I., Borrmann, S., Dietz, K., & Heide, L. (2004). Randomized controlled trial of a traditional preparation of *Artemisia annua* L. (Annual Wormwood) in the treatment of malaria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 98(5), 318–321.

Müller, I. B., & Hyde, J. E. (2010). Antimalarial drugs: modes of action and mechanisms of parasite resistance. *Future Microbiology*, 5(12), 1857–1873.

Müller, S. (2004). Redox and antioxidant systems of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Molecular Microbiology*, 53(5), 1291–1305.

Müller, S., Gilberger, T. W., Krnajski, Z., Lüersen, K., Meierjohann, S., & Walter, R. D. (2001). Thioredoxin and glutathione system of malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Protoplasma*, 217(1–3), 43–49.

Muthaura, C. N., Rukunga, G. M., Chhabra, S. C., Omar, S. A., Guantai, A. N., Gathirwa, J. W., ... Kirira, P. G. (2007). Antimalarial activity of some plants traditionally used in treatment of malaria in Kwale district of Kenya. *Journal of Ethnopharmacology*, 112(3), 545–551.

Nathan, C., & Shiloh, M. U. (2000). Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(16), 8841–8848.

Nepveu, F., & Turrini, F. (2013). Targeting the redox metabolism of *Plasmodium falciparum*. *Future Medicinal Chemistry*, 5(16), 1993–2006.

- Netto, R. de C. M. (2013). Marcadores bioquímicos e moleculares das modificações oxidativas em pacientes com malária vivax.
- Ngarivhume, T., van't Klooster, C. I. E. A., de Jong, J. T. V. M., & Van der Westhuizen, J. H. (2015). Medicinal plants used by traditional healers for the treatment of malaria in the Chipinge district in Zimbabwe. *Journal of Ethnopharmacology*, *159*, 224–237.
- Nickel, C., Rahlfs, S., Deponte, M., Koncarevic, S., & Becker, K. (2006). Thioredoxin networks in the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. *Antioxidants & Redox Signaling*, *8*(7–8), 1227–1239.
- Nuchsongsin, F., Chotivanich, K., Charunwatthana, P., Fausta, O.-S., Taramelli, D., Day, N. P., ... Dondorp, A. M. (2007). Effects of malaria heme products on red blood cell deformability. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *77*(4), 617–622.
- Nyasse, B., Nono, J., Sonke, B., Denier, C., & Fontaine, C. (2004). Trypanocidal activity of bergerin, the major constituent of *Flueggea virosa*, on *Trypanosoma brucei*. *Die Pharmazie—An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, *59*(6), 492–494.
- O'neill, P. M., Barton, V. E., & Ward, S. A. (2010). The molecular mechanism of action of artemisinin—the debate continues. *Molecules*, *15*(3), 1705–1721.
- Oakley, M. S., Gerald, N., McCutchan, T. F., Aravind, L., & Kumar, S. (2011). Clinical and molecular aspects of malaria fever. *Trends in Parasitology*, *27*(10), 442–449.
- Oliveira, P. L., & Oliveira, M. F. (2002). Vampires, Pasteur and reactive oxygen species: Is the switch from aerobic to anaerobic metabolism a preventive antioxidant defence in blood-feeding parasites? *FEBS Letters*, *525*(1–3), 3–6.
- Omer, F. M., & Riley, E. M. (1998). Transforming growth factor β production is inversely correlated with severity of murine malaria infection. *Journal of Experimental Medicine*, *188*(1), 39–48.
- Organização Mundial da Saúde. (2010). Vacinas anti-rábicas: OMS position paper = Vacinas antirrábicas: note d'information de l'OMS. *Wkly epidemiol rec*, *85* (32), 309–320.
- Ozcan, A., & Ogun, M. (2015). Biochemistry of reactive oxygen and nitrogen species. In *Basic Principles and Clinical Significance of Oxidative Stress*. InTech.
- Pabón, A., Carmona, J., Burgos, L. C., & Blair, S. (2003). Oxidative stress in patients with non-complicated malaria. *Clinical Biochemistry*, *36*(1), 71–78.
- Pal, C., & Bandyopadhyay, U. (2012). Redox-active antiparasitic drugs. *Antioxidants & Redox Signaling*, *17*(4), 555–582.
- Paschoal, C. P., & Azevedo, M. F. de. (2009). Cigarette smoking as a risk factor for auditory problems. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*, *75*(6), 893–902.
- Pasvol, G. (2010). Protective hemoglobinopathies and *Plasmodium falciparum* transmission. *Nature Genetics*, *42*(4), 284.
- Percário, S., Moreira, D. R., Gomes, B. A. Q., Ferreira, M. E. S., Gonçalves, A. C. M., Laurindo, P. S. O. C., ... Green, M. D. (2012). Oxidative stress in malaria. *International Journal of Molecular Sciences*, *13*(12), 16346–16372.
- Percario, S., Odorizzi, V. F., Souza, D. R., Pinhel, M. A., Gennari, J. L., Gennari, M. S., & Godoy,

- M. F. (2008). Edible mushroom *Agaricus sylvaticus* can prevent the onset of atheroma plaques in hipercholesterolemic rabbits. *Cell Mol Biol*, 54(Suppl), OL1055-OL1061.
- Pereira, A. C., & Martel, F. (2014). Oxidative stress in pregnancy and fertility pathologies. *Cell Biology and Toxicology*, 30(5), 301–312.
- Poljsak, B., Šuput, D., & Milisav, I. (2013). Achieving the balance between ROS and antioxidants: when to use the synthetic antioxidants. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013.
- Porto, B. N., Alves, L. S., Fernández, P. L., Dutra, T. P., Figueiredo, R. T., Graça-Souza, A. V., & Bozza, M. T. (2007). Heme induces neutrophil migration and reactive oxygen species generation through signaling pathways characteristic of chemotactic receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 282(33), 24430–24436.
- Postma, N. S., Zuidema, J., Mommérs, E. C., & Eling, W. M. C. (1996). Oxidative stress in malaria; implications for prevention and therapy. *Pharmacy World and Science*, 18(4), 121–129.
- Quinlan, C. L., Perevoshchikova, I. V, Hey-Mogensen, M., Orr, A. L., & Brand, M. D. (2013). Sites of reactive oxygen species generation by mitochondria oxidizing different substrates. *Redox Biology*, 1(1), 304–312.
- Rajani, M., & Kanaki, N. S. (2008). Phytochemical standardization of herbal drugs and polyherbal formulations. In *Bioactive Molecules and Medicinal Plants* (pp. 349–369). Springer.
- Rajapakse, S., Rodrigo, C., & Fernando, S. D. (2015). Tafenoquine for preventing relapse in people with *Plasmodium vivax* malaria. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, (4), 1.
- Rebuglio Velloso, J. C., Chibinski Parabocz, G., Manente, F. A., Tonin Ribas, J., & Werle Lima, L. (2013). Alterações metabólicas e inflamatórias em condições de estresse oxidativo. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 34(3), 305–312.
- Rosales, F. J., Topping, J. D., Smith, J. E., Shankar, A. H., & Ross, A. C. (2000). Relation of serum retinol to acute phase proteins and malarial morbidity in Papua New Guinea children. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 71(6), 1582–1588.
- Russo, C., & Bracarense, A. P. F. R. L. (2016). Oxidative stress in dogs. *Semina: Ciências Agrárias*, 37(3), 1431–1439.
- Sachetti, C. G., Fascineli, M. L., Sampaio, J. A., Lameira, O. A., & Caldas, E. D. (2009). Avaliação da toxicidade aguda e potencial neurotóxico do óleo-resina de copaíba (*Copaifera reticulata* Ducke, Fabaceae). *Braz. J. Pharmacog*, 19, 937–941.
- Sahu, P., Pinkalwar, N., Dubey, R. D., Paroha, S., Chatterjee, S., & Chatterjee, T. (2011). Biomarkers: an emerging tool for diagnosis of a disease and drug development. *Asian Journal of Research in Pharmaceutical Science*, 1(1), 9–16.
- Sales, R. P., & Percário, S. (2001). Devemos Avaliar o Estresse Oxidativo ea defesa Antioxidante em Nossos Pacientes. *Laes Haes*, 22, 122–142.
- Sashidhara, K. V, Singh, S. P., Singh, S. V., Srivastava, R. K., Srivastava, K., Saxena, J. K., & Puri, S. K. (2013). Isolation and identification of β -hematin inhibitors from *Flacourtia indica* as promising antiplasmodial agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 60, 497–502.

- Schneider, P., Bousema, J. T., Gouagna, L. C., Otieno, S., Van De Vegte-Bolmer, M., Omar, S. A., & Sauerwein, R. W. (2007). Submicroscopic *Plasmodium falciparum* gametocyte densities frequently result in mosquito infection. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 76(3), 470–474.
- Scholl, P. F., Tripathi, A. K., & Sullivan, D. J. (2005). Bioavailable iron and heme metabolism in *Plasmodium falciparum*. In *Malaria: drugs, disease and post-genomic biology* (pp. 293–324). Springer.
- Seixas, E., Gozzelino, R., Chora, Â., Ferreira, A., Silva, G., Larsen, R., ... Coutinho, A. (2009). Heme oxygenase-1 affords protection against noncerebral forms of severe malaria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(37), 15837–15842.
- Sena, L. A., & Chandel, N. S. (2012). Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. *Molecular Cell*, 48(2), 158–167.
- Shantha, K. N., Sheethal, K. C., & Rashmi, T. M. (2013). Antioxidant status, oxidative stress and lipid profile in essential hypertensive men. *Journal of Evolution of Medical and Dental Sciences*, 2(17), 2950–2956.
- Shestivska, V., Antonowicz, S. S., Dryahina, K., Kubišta, J., Smith, D., & Španěl, P. (2015). Direct detection and quantification of malondialdehyde vapour in humid air using selected ion flow tube mass spectrometry supported by gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 29(11), 1069–1079.
- Silva, C. T. da, & Jasiulionis, M. G. (2014). Relação entre estresse oxidativo, alterações epigenéticas e câncer. *Ciência e Cultura*, 66(1), 38–42.
- Singh, B., & Daneshvar, C. (2013). Human infections and detection of *Plasmodium knowlesi*. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(2), 165–184.
- Sohail, M., Kaul, A., Raziuddin, M., & Adak, T. (2007). Decreased glutathione-S-transferase activity: Diagnostic and protective role in vivax malaria. *Clinical Biochemistry*, 40(5–6), 377–382.
- Solary, E., Mannone, L., Moreau, D., Caillot, D., Casasnovas, R. O., Guy, H., ... Fenaux, P. (2000). Phase I study of cinchonine, a multidrug resistance reversing agent, combined with the CHVP regimen in relapsed and refractory lymphoproliferative syndromes. *Leukemia*, 14(12), 2085.
- Solomon, V. R., & Lee, H. (2009). Chloroquine and its analogs: a new promise of an old drug for effective and safe cancer therapies. *European Journal of Pharmacology*, 625(1–3), 220–233.
- Sorriento, D., De Luca, N., Trimarco, B., & Iaccarino, G. (2018). The antioxidant therapy: new insights in the treatment of hypertension. *Frontiers in Physiology*, 9, 258.
- Sousa, F. (2010). *Diferenciação curricular e deliberação docente*. Porto Editora.
- Sowunmi, A., Salako, L. A., Laoye, O. J., & Aderounmu, A. F. (1990). Combination of quinine, quinidine and cinchonine for the treatment of acute *falciparum* malaria: correlation with the susceptibility of *Plasmodium falciparum* to the cinchona alkaloids in vitro. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 84(5), 626–629.
- Spence, P. J., & Langhorne, J. (2012). T cell control of malaria pathogenesis. *Current Opinion in Immunology*, 24(4), 444–448.

- Szadujkis-Szadurski, L., Szadujkis-Szadurski, R., Szadujkis-Szadurska, K., Skublicki, S., & Szymanski, W. (2004). Nitric oxide modulates angiotensin II-evoked Ca²⁺-release and influx responses in human chorionic arteries. *Fundamental and Clinical Pharmacology Supplement*, 18, 77.
- Tilley, L., Loria, P., & Foley, M. (2001). Chloroquine and other quinoline antimalarials. In *Antimalarial chemotherapy* (pp. 87–121). Springer.
- Timsit, J.-F., Schwebel, C., Bouadma, L., Geffroy, A., Garrouste-Orgeas, M., Pease, S., ... Gestin, B. (2009). Chlorhexidine-impregnated sponges and less frequent dressing changes for prevention of catheter-related infections in critically ill adults: a randomized controlled trial. *Jama*, 301(12), 1231–1241.
- Titulaer, H. A. C., Zuidema, J., Kager, P. A., Wetsteyn, J., Lugt, C. B., & Merkus, F. (1990). The pharmacokinetics of artemisinin after oral, intramuscular and rectal administration to volunteers. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 42(11), 810–813.
- Tobón Castaño, A., Piñeros Jiménez, J. G., Blair Trujillo, S., & CARMONA-FONSECA, J. (2006). Clínica de la malaria complicada debida a *P. falciparum* Estudio de casos y controles en Tumaco y Turbo (Colombia). *Iatreia*, 19(4).
- Toler, S. (2005). The plasmodial apicoplast was retained under evolutionary selective pressure to assuage blood stage oxidative stress. *Medical Hypotheses*, 65(4), 683–690.
- Totino, P. R. R., Magalhães, A. D., Silva, L. A., Banic, D. M., Daniel-Ribeiro, C. T., & de Fátima Ferreira-da-Cruz, M. (2010). Apoptosis of non-parasitized red blood cells in malaria: a putative mechanism involved in the pathogenesis of anaemia. *Malaria Journal*, 9(1), 350.
- Tu, Y. (2011). The discovery of artemisinin (qinghaosu) and gifts from Chinese medicine. *Nature Medicine*, 17(10), 1217.
- Turner, L., Lavstsen, T., Berger, S. S., Wang, C. W., Petersen, J. E. V, Avril, M., ... Nielsen, M. A. (2013). Severe malaria is associated with parasite binding to endothelial protein C receptor. *Nature*, 498(7455), 502.
- Urscher, M., Przyborski, J. M., Imoto, M., & Deponte, M. (2010). Distinct subcellular localization in the cytosol and apicoplast, unexpected dimerization and inhibition of Plasmodium falciparum glyoxalases. *Molecular Microbiology*, 76(1), 92–103.
- Valecha, N., Mohanty, S., Srivastava, P., Sharma, S., Tyagi, P., Bergqvist, Y., & Ringwald, P. (2012). Efficacy of artemether-lumefantrine in area of high malaria endemicity in India and its correlation with blood concentration of lumefantrine. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 86(3), 395–397.
- Velasco, E., Gomez-Barroso, D., Varela, C., Diaz, O., & Cano, R. (2017). Non-imported malaria in non-endemic countries: a review of cases in Spain. *Malaria Journal*, 16(1), 260.
- Waisberg, M., Cerqueira, G. C., Yager, S. B., Francischetti, I. M. B., Lu, J., Gera, N., ... Lukszo, J. (2012). Plasmodium falciparum merozoite surface protein 1 blocks the proinflammatory protein S100P. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(14), 5429–5434.
- Walker, D. M., Oghumu, S., Gupta, G., McGwire, B. S., Drew, M. E., & Satoskar, A. R. (2014). Mechanisms of cellular invasion by intracellular parasites. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 71(7), 1245–1263.

- Walther, M., Jeffries, D., Finney, O. C., Njie, M., Ebonyi, A., Deininger, S., ... Cheeseman, I. H. (2009). Distinct roles for FOXP3⁺ and FOXP3⁻ CD4⁺ T cells in regulating cellular immunity to uncomplicated and severe *Plasmodium falciparum* malaria. *PLoS Pathogens*, 5(4), e1000364.
- Weathers, P. J., Arsenault, P. R., Covello, P. S., McMickle, A., Teoh, K. H., & Reed, D. W. (2011). Artemisinin production in *Artemisia annua*: studies in planta and results of a novel delivery method for treating malaria and other neglected diseases. *Phytochemistry Reviews*, 10(2), 173–183.
- Weathers, P. J., & Towler, M. J. (2012). The flavonoids casticin and artemetin are poorly extracted and are unstable in an *Artemisia annua* tea infusion. *Planta Medica*, 78(10), 1024.
- Wesche, D. L., & Black, J. (1990). A comparison of the antimalarial activity of the cinchona alkaloids against *Plasmodium falciparum* in vitro. *The Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 93(3), 153–159.
- White, N. J. (2011). Determinants of relapse periodicity in *Plasmodium vivax* malaria. *Malaria Journal*, 10(1), 297.
- White, N. J., Turner, G. D. H., Day, N. P. J., & Dondorp, A. M. (2013). Lethal malaria: Marchiafava and Bignami were right. *The Journal of Infectious Diseases*, 208(2), 192–198.
- Willcox, M. (2009). *Artemisia* species: from traditional medicines to modern antimalarials—and back again. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 15(2), 101–109.
- Willcox, M. (2011). Improved traditional phytomedicines in current use for the clinical treatment of malaria. *Planta Medica*, 77(06), 662–671.
- Willcox, M., Bodeker, G., & Rasoanaivo, P. (2005). Traditional Medicinal Plants and Malaria: Volume 4 of the Traditional Herbal Medicine for Modern Times Series. *Journal of Alternative & Complementary Medicine*, 11(2), 381–382.
- World Health Organization. (2010). Malaria rapid diagnostic test performance. Results of WHO product testing of malaria RDTs: Round 2. *Malaria Rapid Diagnostic Test Performance. Results of WHO Product Testing of Malaria RDTs: Round 2*.
- World Health Organization. (2011). Global tuberculosis control: WHO report 2011.
- World Health Organization. (2015). *World malaria report 2014*. World Health Organization.
- World Health Organization. (2016). *World malaria report 2015*. World Health Organization.
- Wright, C. W. (2005). Traditional antimalarials and the development of novel antimalarial drugs. *Journal of Ethnopharmacology*, 100(1–2), 67–71.
- Yazar, S., Kilic, E., Saraymen, R., & Ozbilge, H. (2004). Serum malondialdehyde levels in patients infected with *Plasmodium vivax*. *The West Indian Medical Journal*, 53(3), 147–149.
- Zhang, H., & Oweis, T. (1999). Water–yield relations and optimal irrigation scheduling of wheat in the Mediterranean region. *Agricultural Water Management*, 38(3), 195–211.

