

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: IMUNOLOGIA E
DOENÇAS INFECTO-PARASITÁRIAS/GENÉTICA E BIOTECNOLOGIA

Felipe Oliveira Raimundo

**AVALIAÇÃO IN SILICO, IN VITRO E IN VIVO DA AÇÃO ESQUIZONTICIDA
SANGUÍNEA DE COMPOSTOS AMINOQUINOLÍNICOS**

Juiz de Fora

2024

Felipe Oliveira Raimundo

**AVALIAÇÃO IN SILICO, IN VITRO E IN VIVO DA AÇÃO ESQUIZONTICIDA
SANGUÍNEA DE COMPOSTOS AMINOQUINOLÍNICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias/Genética e Biotecnologia, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas. Área de concentração: Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias/Genética e Biotecnologia.

Orientadora: Prof. Dra. Kézia Katiani Gorza Scopel

Coorientador: Prof. Dra. Jéssica Corrêa Bezerra Bellei

Juiz de Fora

2024

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Oliveira Raimundo, Felipe.

AVALIAÇÃO IN SILICO, IN VITRO E IN VIVO DA AÇÃO ESQUIZONTICIDA DE COMPOSTOS AMINOQUINOLÍNICOS : 16 compostos aminoquinolínicos na terapia antimalárica / Felipe Oliveira Raimundo. -- 2024.

77 p. : il.

Orientadora: Kézia Katiani Gorza Scopel

Coorientadora: Jéssica Correa B. Bellei

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2024.

1. Malária. 2. Quimioterapia Antimalárica. 3. Compostos Aminoquinolínicos. I. Katiani Gorza Scopel, Kézia , orient. II. Correa B. Bellei, Jéssica, coorient. III. Título.

Felipe Oliveira Raimundo

**AVALIAÇÃO IN SILICO, IN VITRO E IN VIVO DA AÇÃO ESQUIZONTICIDA
SANGUÍNEA DE COMPOSTOS AMINOQUINOLÍNICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias/Genética e Biotecnologia, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas. Área de concentração: Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias/Genética e Biotecnologia.

Aprovada em 13 de maio de 2024.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Kezia Katiani Gorza Scopel - Orientadora
Universidade Federal de Juiz de Fora

Profa. Dra. Clarice Abramo
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Fernando de Pilla Varotti
Universidade Federal de São João Del Rei

Juiz de Fora, 15/04/2024.



Documento assinado eletronicamente por Kezia Katiani Gorza Scopel, Professor(a), em 10/05/2024, às 16:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º

PROPP 01.5. Termo de aprovação COORD-PPG-IMUNOLOGIA 1782242

SEI 23071.913206/2024-49 / pg. 1



do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Fernando de Pilla Varotti, Usuário Externo, em 10/05/2024, às 20:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Clarice Abramo, Professor(a), em 10/05/2024, às 21:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador 1782242 e o código CRC 7632EB1D.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, aos santos e a todos os anjos que olharam e me guiaram sempre para o melhor caminho. Aos meus pais, já logo digo que não há palavras nem ações que possam retribuir o que fizeram por mim. À minha irmã linda, a pessoa que mais amo nesse mundo e por quem faria qualquer coisa, agradeço por ser uma inspiração e por cuidar com tanto carinho de mim. Agradeço a todos os professores que tive em minha vida, em especial à minha orientadora Kézia que me acolheu com muito carinho e paciência e me ensinou muito mais do que ela pode imaginar. Agradeço aos professores e examinadores dessa banca por dedicarem seu tempo avaliando meu trabalho. Agradeço a cooperação e parceria de toda a equipe do ICE, em especial ao professor Adilson. Um abraço para todos do laboratório de parasitologia, em especial para a Jéssica, que me auxiliou durante todo o processo. Você é especial! Além de toda a nossa equipe do laboratório de parasitologia, preciso também dedicar um espaço para Ana, que passou junto comigo os momentos mais difíceis dessa trajetória. Morro de saudades! Aos meus amigos, obrigado por serem tão sinceros, honestos e leais a mim. Em especial, ao Renan e Matheus por conviverem quase que diariamente comigo, sempre dispostos a dar risadas. Gostaria de tê-los agradecido há muito tempo antes, porém são nos fechamentos de ciclo que paramos para olhar para trás. Que tiremos de lição que não devemos esperar o fim de uma trajetória para olhar para as pessoas queridas de nossa vida e agradecê-las por existirem.

RESUMO

Com 247 milhões de novos casos e 619.000 mortes em 2021, a malária ainda permanece como um desafio para saúde pública em todo o mundo. Na África se concentra 96% dos números de casos de malária e *Plasmodium falciparum*, considerada a espécie mais prevalente no continente africano, apresenta resistência a diversos antimaláricos. As Américas, o Pacífico Ocidental, o Sudeste Asiático e o Mediterrâneo Oriental, afetados principalmente por *Plasmodium vivax*, também apresentam resistência aos medicamentos antimaláricos utilizados na terapêutica. A busca por novas drogas para o tratamento da malária é considerada uma questão emergencial e fundamental para evitar as altas taxas atuais de morbimortalidade da doença, uma vez que há um crescente desenvolvimento e disseminação de parasitos resistentes aos antimaláricos convencionais. Dentre os medicamentos antimaláricos, aqueles pertencentes a classe dos aminoquinolônicos atuam inibindo a polimerização da hemoglobina em hemozoína durante o ciclo de vida sexual do parasito. Esse estudo tem como objetivo avaliar o potencial antimalárico de 16 novos compostos aminoquinolônicos sintéticos. As 16 novas drogas sintetizadas foram avaliadas quanto suas propriedades farmacocinéticas, físico químicas, atividade *in vitro* de citotoxicidade e atividade antiplasmodial. As mais promissoras *in vitro* foram, então, avaliadas em modelo animal de infecção malárica. Os resultados farmacocinéticos sugeriram boa absorção e biodisponibilidade oral para as moléculas testadas. Para a molécula mais promissora, o composto 9, foram realizados estudos de ancoragem molecular, demonstrando afinidade pelos receptores do vacúolo parasitóforo do parasito, sugerindo mecanismo de ação similar ao da cloroquina. Foram encontrados resultados satisfatórios do composto 9 para atividade antiplasmodial *in vitro* de IC₅₀ (0,44 µM/ml), CC₅₀ (>100 µM/ml) e dados de índice de seletividade *in vitro* da atividade antiplasmodial de 226 (droga padrão cloroquina obteve 152). Os testes *in vivo* para o composto 9 indicaram boa inibição de multiplicação do parasito até o décimo dia de infecção (31,02%). A interação com complexo ferriprotoporfirina foi investigada por titulação espectrofotométrica UV-Vis e seu resultado foi comparativamente similar ao da cloroquina (Log K do composto = 4,66, Log K cloroquina = 4,97), sugerindo esse provável mecanismo de ação. Dados bioquímicos não demonstraram toxicidade para o modelo murino em relação às doses testadas (15 mg/kg e 50 mg/kg). Em conclusão, as moléculas derivadas do anel aminoquinolônico, especialmente o composto 9, mostram-se promissoras para estudos futuros que objetivam a renovação terapêutica, tão essencial para o controle da malária.

Palavras-chave: Malária. Quimioterapia antimalárica. Aminoquinolona.

ABSTRACT

With 247 million new cases and 619,000 deaths in 2021, malaria still remains a public health challenge worldwide. 96% of malaria cases are concentrated in Africa and *Plasmodium falciparum*, considered the most prevalent species on the African continent, is resistant to several antimalarials. The Americas, the Western Pacific, Southeast Asia and the Eastern Mediterranean, mainly affected by *Plasmodium vivax*, also present resistance to the antimalarial drugs used in therapy. The search for new drugs to treat malaria is considered an emergency and fundamental issue to avoid the current high rates of morbidity and mortality from the disease, since there is an increasing development and dissemination of parasites resistant to conventional antimalarials. Among antimalarial medications, those belonging to the aminoquinoline class act by inhibiting the polymerization of hemoglobin into hemozoin during the parasite's sexual life cycle. This study aims to evaluate the antimalarial potential of 16 new synthetic aminoquinoline compounds. The 16 new synthesized drugs were evaluated for their pharmacokinetic, physical-chemical properties, in vitro cytotoxicity activity and antiplasmodial activity. The most promising in vitro studies were then evaluated in an animal model of malaria infection. The pharmacokinetic results suggested good absorption and oral bioavailability for the tested molecules. For the most promising molecule, compound 9, docking molecular studies were carried out, demonstrating affinity for the receptors of the parasitophorous vacuole of the parasite, suggesting a mechanism of action similar to that of chloroquine. Satisfactory results were found for compound 9 for in vitro antiplasmodial activity of IC_{50} (0.44 μ M/ml), CC_{50} (>100 μ M/ml) and in vitro selectivity index data for antiplasmodial activity of 226 (standard drug chloroquine obtained 152). In vivo tests for compound 9 indicated good inhibition of parasite multiplication up to the tenth day of infection (31.02%). The interaction with ferriprotoporphyrin complex was investigated by UV-Vis spectrophotometric titration and its result was comparatively similar to that of chloroquine (Log K of the compound = 4.66, Log K of chloroquine = 4.97), suggesting this probable mechanism of action. Biochemical data did not demonstrate toxicity for the murine model in relation to the doses tested (15 mg/kg and 50 mg/kg). In conclusion, molecules derived from the aminoquinoline ring, especially compound 9, show promise for future studies aimed at therapeutic renewal, which is so essential for the control of malaria.

Keywords: Malaria. Antimalarial chemotherapy. Aminoquinolone.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | | |
|-------------|---|----|
| Figura 1 - | Mapa da taxa de incidência de casos de malária (casos por 1000 habitantes em risco) no mundo, 2021..... | 13 |
| Figura 2 - | Risco de malária por município em 2022..... | 14 |
| Figura 3 - | Representação esquemática de estruturas e organelas do merozoíto de Plasmodium..... | 16 |
| Figura 4 - | Ciclo de vida dos plasmódios nos hospedeiros humano e invertebrado..... | 17 |
| Figura 5 - | Classes química dos fármacos antimaláricos..... | 20 |
| Figura 6 - | Mecanismo de ação da cloroquina..... | 22 |
| Figura 7 - | Medicamentos antimaláricos derivados do anel quinolínico..... | 23 |
| Figura 8 - | Descoberta e resistência aos antimaláricos por <i>P. falciparum</i> | 28 |
| Figura 9 - | Titulação espectrofotométrica UV-Vis do composto 9..... | 53 |
| Figura 10 - | Testes de função hepática [ALT (A), AST (B)] e renal [ureia (C), creatinina (D)]..... | 55 |
| Figura 11 - | Análise histopatológica do fígado..... | 56 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|------------|---|----|
| Tabela 1 - | Principais antimaláricos disponíveis e seus estágios alvo no parasito..... | 25 |
| Tabela 2 - | Derivados aminoquinolínicos sintéticos..... | 31 |
| Tabela 3 - | Resultados <i>in silico</i> de compostos derivados de anel quinolínico..... | 44 |
| Tabela 4 - | Valores de energia de ligação (kcal/mol) dos compostos aminoquinolínicos..... | 45 |
| Tabela 5 - | Resultados <i>in vitro</i> para a citotoxicidade (CC ₅₀), atividade antiplasmodial (IC ₅₀) e índice de seletividade dos compostos contra a cepa W2 de <i>Plasmodium falciparum</i> , na linha celular humana WI-26-VA-4 (CC ₅₀) e índice de seletividade..... | 49 |
| Tabela 6 - | Resultados de IMP dos compostos 7, 9 e 10..... | 50 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|------------------|--|
| AMA-1 | Antígeno 1 de membrana apical do merozoíto |
| ART | Artesunato |
| ATC | Terapia combinada a base de artemisinina |
| BHE | Barreira hematoencefálica |
| CC ₅₀ | Concentração que reduz a viabilidade celular em 50% |
| CRT | Transportador de resistência à cloroquina |
| CSP | Proteína circunsporozoíta |
| CQ | Cloroquina |
| CYP 450 | Enzimas do citocromo 450 |
| DP | Desvio padrão |
| Fe(II)PPIX | Ferriprotoporfirina IX |
| Fe(III)PPIX | Ferriprotoporfirina IX oxidada |
| GPI | Glicofosfatidilinositol |
| IC ₅₀ | Concentração inibitória que reduz o crescimento do parasito em 50% |
| IMP | Inibição da Multiplicação do Parasito |
| IPA | Incidência Parasitária Anual |
| IS | Índice de seletividade |
| MSP-1 | Proteína 1 de superfície do merozoíto |
| MTT | Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio |
| NA | Nenhuma atividade antiplasmodial |
| OMS | Organização Mundial de Saúde |
| ORAL BIOD | Biodisponibilidade oral |
| pRBC | Hemácias parasitadas |
| RPMI | Roswell Park Memorial Institute |
| TGI | Trato gastro intestinal |
| TGO | Transaminase oxalacética |
| TGP | Transaminase pirúvica |
| TRAP | Proteína adesiva relacionada a trombospondina |
| VP | Vacúolo parasitóforo |

SUMÁRIO

| | | |
|--------------|---|-----------|
| 1 | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 12 |
| 1.1 | MALÁRIA NO MUNDO E NO BRASIL..... | 12 |
| 1.2 | CICLO DE VIDA DO PLASMÓDIO..... | 14 |
| 1.3 | ASPECTOS CLÍNICOS DA MALÁRIA..... | 17 |
| 1.4 | QUIMIOTERAPIA ANTIMALÁRICA..... | 19 |
| 1.4.1 | Principais antimaláricos utilizados na terapêutica..... | 21 |
| 1.5 | RESISTÊNCIA AOS ANTIMALÁRICOS..... | 25 |
| 2 | JUSTIFICATIVA..... | 29 |
| 3 | OBJETIVOS..... | 30 |
| 3.1 | OBJETIVO GERAL..... | 30 |
| 3.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 30 |
| 4 | MATERIAIS E MÉTODOS..... | 31 |
| 4.1 | OBTENÇÃO DOS COMPOSTOS SINTÉTICOS..... | 31 |
| 4.2 | AVALIAÇÃO <i>IN SILICO</i> DE PARÂMETROS FÍSICO QUÍMICOS E FARMACOCINÉTICOS..... | 34 |
| 4.3 | REALIZAÇÃO, <i>IN SILICO</i> , O DOCKING MOLECULAR DOS COMPOSTOS PARA IDENTIFICAR O POSSÍVEL ALVO DE INTERAÇÃO..... | 35 |
| 4.4 | AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> : CITOTOXICIDADE E ATIVIDADE ANTIPLASMODIAL..... | 36 |
| 4.5 | AVALIAÇÃO <i>IN VIVO</i> DA ATIVIDADE ANTIMALÁRICA..... | 38 |
| 4.6 | DOSAGEM SOROLÓGICA DOS ANIMAIS TRATADOS..... | 39 |
| 4.7 | ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DOS ANIMAIS TRATADOS..... | 40 |
| 4.8 | INTERAÇÃO DO COMPOSTO COM A FERRIPROTOPORFIRINA..... | 41 |
| 4.9 | ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 41 |
| 5 | RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 42 |
| 5.1 | AVALIAÇÃO <i>IN SILICO</i> DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICA E FARMACOCINÉTICAS DE ABSORÇÃO DOS COMPOSTOS..... | 42 |
| 5.2 | REALIZAÇÃO, <i>IN SILICO</i> DE DOCKING MOLECULAR DOS COMPOSTOS PARA IDENTIFICAR O POSSÍVEL ALVO DE INTERAÇÃO..... | 45 |
| 5.3 | AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE CITOTOXICIDADE E ATIVIDADE ANTIPLASMODIAL..... | 47 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 5.4 | AVALIAÇÃO IN VITRO DA INIBIÇÃO DA MULTIPLICAÇÃO DO PARASITO (IMP)..... | 49 |
| 5.5 | INTERAÇÃO DO COMPOSTO 9 COM FERRIPROTOPORFIRINA..... | 52 |
| 5.6 | RESULTADOS DE DOSAGEM SOROLÓGICA DO COMPOSTO 9..... | 53 |
| 5.7 | RESULTADOS HISTOPATOLÓGICOS DO COMPOSTO 9..... | 55 |
| 6 | CONCLUSÕES..... | 58 |
| | REFERÊNCIAS..... | 59 |
| | ANEXO A - Certificado CEUA..... | 68 |
| | ANEXO B – Artigos publicados em colaboração durante o mestrado..... | 70 |

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 MALÁRIA NO MUNDO E NO BRASIL

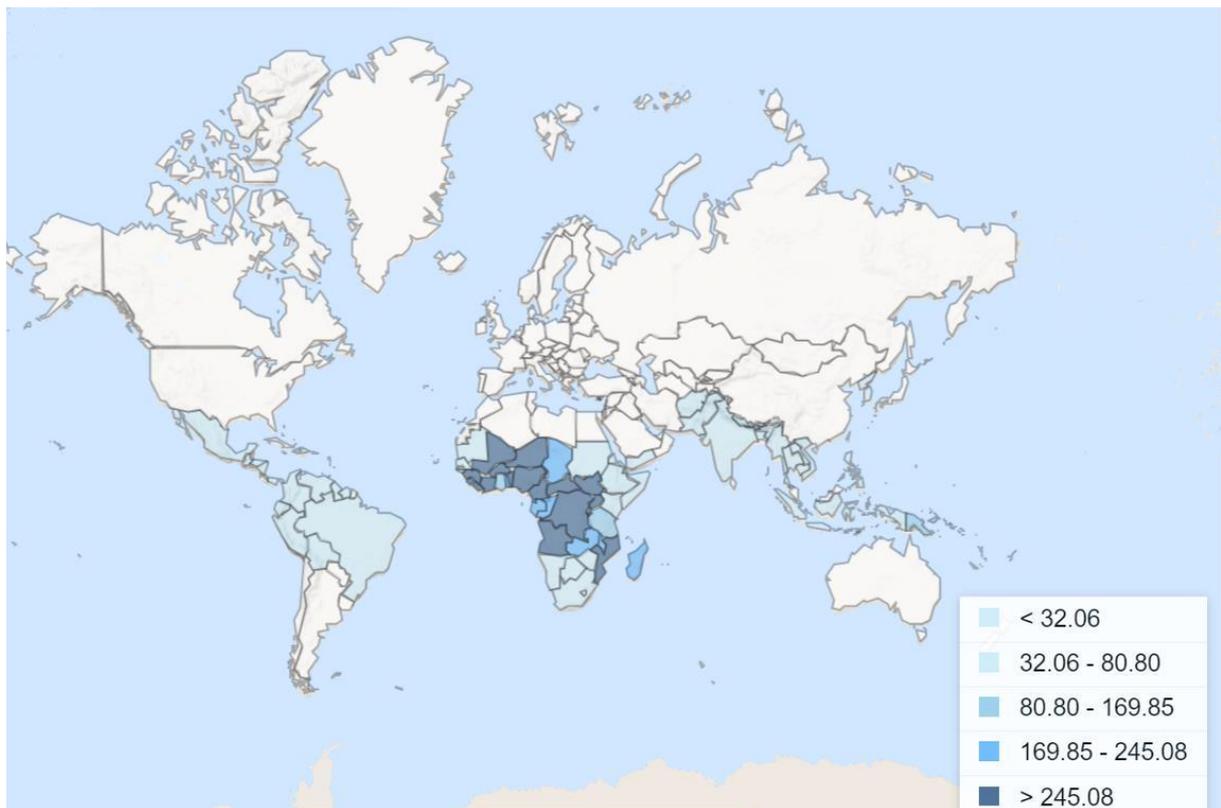
De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a malária é um problema em saúde pública. Dados epidemiológicos recentes indicam que em 2020 houve um aumento em número de casos de malária em cerca de 12% se comparado ao ano anterior. O aumento do número de casos credita-se principalmente à grande sobrecarga dos serviços de saúde durante a pandemia do coronavírus tanto no continente africano, quanto no resto do mundo. Entretanto, outros fatores como resistência às terapias convencionais e falta de notificações sobre a efetivação da terapia antimalárica também vêm contribuindo para esse aumento (Plowe, 2022; Who, 2022).

A malária, transmitida pela fêmea do mosquito *Anopheles* infectado, é uma enfermidade causada pelo protozoário pertencente ao gênero *Plasmodium*. As cinco espécies identificadas como agentes etiológicos da infecção em seres humanos, são *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* e *Plasmodium knowlesi*. No entanto, *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium vivax* assumem relevância clínica preponderante, sendo *P. falciparum* a espécie mais virulenta e, assim, responsável pela maioria das mortes por malária em âmbito global. *P. knowlesi*, anteriormente exclusivo à infecção de primatas não humanos, foi reclassificado como o quinto parasita da malária humana após a identificação de seu potencial zoonótico no Sudeste Asiático. Além disso, outras duas espécies de *Plasmodium* de primatas não humanos, *Plasmodium simium* na América do Sul e *Plasmodium cynomolgi* no Sudeste Asiático, têm sido objeto de investigações devido à subnotificação pela semelhança com outras espécies e a capacidade de infectar seres humanos (Antinori *et al.*, 2013; Brasil *et al.*, 2017; Alvarenga *et al.*, 2018; Imwong *et al.*, 2019; Oms, 2020; Singh *et al.*, 2004; Ta *et al.*, 2014).

A África é o continente mais impactado pela malária, sendo a África Subsaariana a região de maior risco e *P. falciparum* a espécie prevalente. Crianças com idade entre 6 meses e 5 anos e mulheres primigestas são o grupo mais vulnerável e com maiores chances de desenvolver a forma grave da doença. Em 2020, 94% das mortes em todo mundo estavam concentradas no continente africano, com um total de 228 milhões de casos, sendo que 67% correspondem apenas a crianças menores de 5 anos de idade. A **figura 1** abaixo ilustra a incidência de casos em malária no mundo a cada 1000 habitantes, em 2021 (Who, 2021).

P. vivax é a espécie prevalente que assume fundamental relevância nas Américas, Sudeste Asiático, Pacífico Ocidental, Leste do Mediterrâneo e em outros países, sendo responsável por extrema morbidade. Além disso, casos graves e óbitos vêm sendo associados a essa espécie em todo o mundo, incluindo Brasil. (Greenwood *et al.*, 1987; Who, 2021).

Figura 1 - Mapa da taxa de incidência de casos de malária (casos por 1000 habitantes em risco) no mundo, 2021

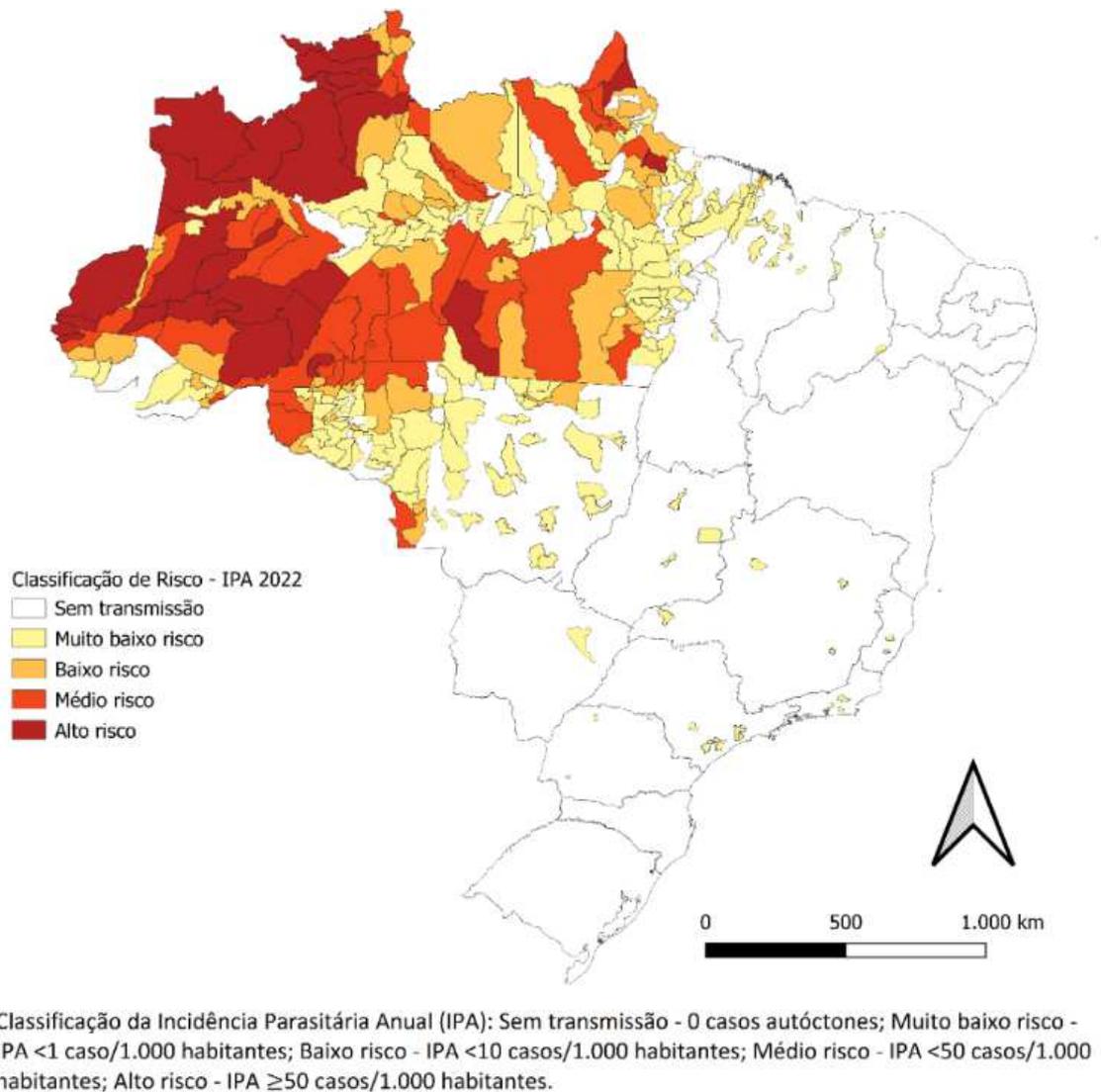


Fonte: Who the world bank (2024).

No Brasil, a transmissão por *P. vivax* corresponde a cerca de 89% dos casos notificados. Entretanto, também há registro de infecção pelas espécies *P. falciparum* e *P. malariae*, assim como infecções mistas. A região da Amazônia legal brasileira, formada pelos estados Amazonas, Pará, Acre, Rondônia, Roraima, Tocantins, Maranhão e Mato Grosso concentra 99.9% dos casos de malária no país. Em 2020 as notificações compartilhadas indicam 145.188 casos da doença e 44 óbitos. Os óbitos em malária estão associados a casos de infecção por *P. falciparum* e malária mista (Brasil, 2020; Ministério da saúde, 2021). A **figura 2** ilustra a condição epidemiológica do país em 2022, sob a medida de Incidência Parasitária Anual (IPA), que denota o número de casos novos autóctones (excluindo notificações de recaídas) de malária por mil habitantes.

Fora da área endêmica, casos autóctones de malária humana na Mata Atlântica estão associados ao *Plasmodium simium*, o qual demonstra morfologia, imunologia e genética semelhante ao *Plasmodium vivax*. A ocorrência de infecções humanas por *Plasmodium simium* na região da Mata Atlântica Brasileira levanta a possibilidade de que este parasita, antes diagnosticado equivocadamente como *Plasmodium vivax* devido à carência de técnicas de tipagem molecular, possa ter historicamente infectado seres humanos nessa região ou adquirido esse potencial zoonótico em um período recente (Brasil, 2017; Coatney *et al.*, 1971; Collins *et al.*, 1969; Deane *et al.*, 1966; Goldman *et al.*, 1993).

Figura 2 - Risco de malária por município em 2022



Fonte: Sivep-Malária e Sinan/SVSA/MS e E-SUS-VS.

1.2 CICLO DE VIDA DO PLASMÓDIO

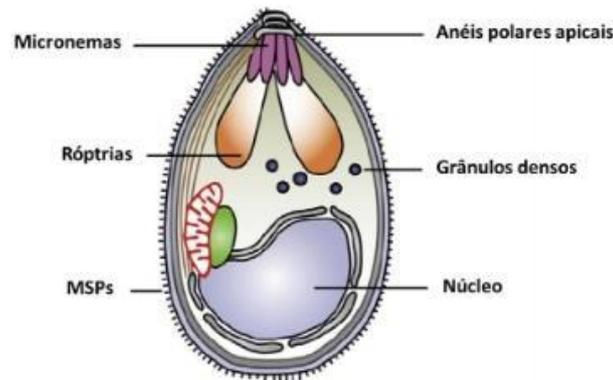
O parasito responsável pela malária pertence ao gênero *Plasmodium*, da família *Plasmodiidae* e filo Apicomplexa, sendo intracelulares obrigatórios. Seu ciclo envolve o mosquito fêmea do gênero *Anopheles*, onde ocorre a reprodução sexuada, e um hospedeiro vertebrado intermediário onde ocorre a reprodução assexuada (Mueller *et al.*, 2009).

Após o vetor ingerir gametócitos presentes na corrente sanguínea do hospedeiro, a reprodução sexuada inicia-se com a fusão dos gametas masculino e feminino, ocasionando a fecundação do zigoto no estômago do mosquito. Posteriormente, o zigoto matura e se torna móvel e alongado, passando a ser chamado de oocineto. A motilidade permite que o oocineto atravesse a membrana epitelial do estômago do inseto, encistando-se e formando o oocisto. O fim desse processo culmina no início da esporogonia, que leva à formação de esporozoítos. Essa forma infectante do parasito é transportada da hemolinfa até as glândulas salivares do mosquito onde ficam alojadas até o repasto sanguíneo infectante (Ashley *et al.*, 2018).

Durante o repasto sanguíneo do vetor são inoculados, juntamente com a saliva do mosquito, cerca de 15 a 200 esporozoítos sob a derme do hospedeiro vertebrado. Esses esporozoítos são a forma infectante do parasito e se direcionam, através da corrente sanguínea, para o fígado, ultrapassando sua barreira e infectando os hepatócitos. O reconhecimento dos hepatócitos pelos esporozoítos envolve a interação de duas proteínas de superfície: a proteína adesiva relacionada a trombospondina (TRAP), e a proteína circunsporozoíta (CSP), que garante a locomoção e também auxiliam na invasão do hepatócito via receptores heparan sulfato (Lindner; Miller; Kapp, 2012; Sultan *et al.*, 1997).

Na fase hepática, o parasito invade a célula hospedeira com ação de micronemas e de proteínas das roptrias, análogas aos grânulos lisossomais de mamíferos (figura 3). O parasito, por invaginação na célula, gera o vacúolo parasitóforo (VP), após a remodelação de algumas proteínas do *Plasmodium*. Dentro do vacúolo parasitóforo, o parasito se protege de enzimas lisossomais do hospedeiro e, por esquizogonia, se reproduz. Essa etapa de reprodução assexuada é denominada esquizogonia tecidual ou exoeritrocítica. No fígado, as espécies *P. vivax* e *P. ovale* também são capazes de desenvolver hipnozoítos, formas latentes que podem permanecer por semanas, meses ou anos após o primeiro contato com a infecção e ocasionar recaídas tardias da doença (Belachew, 2018; Mueller *et al.*, 2009).

Figura 3 - Representação esquemática de estruturas e organelas do merozoíto de Plasmodium



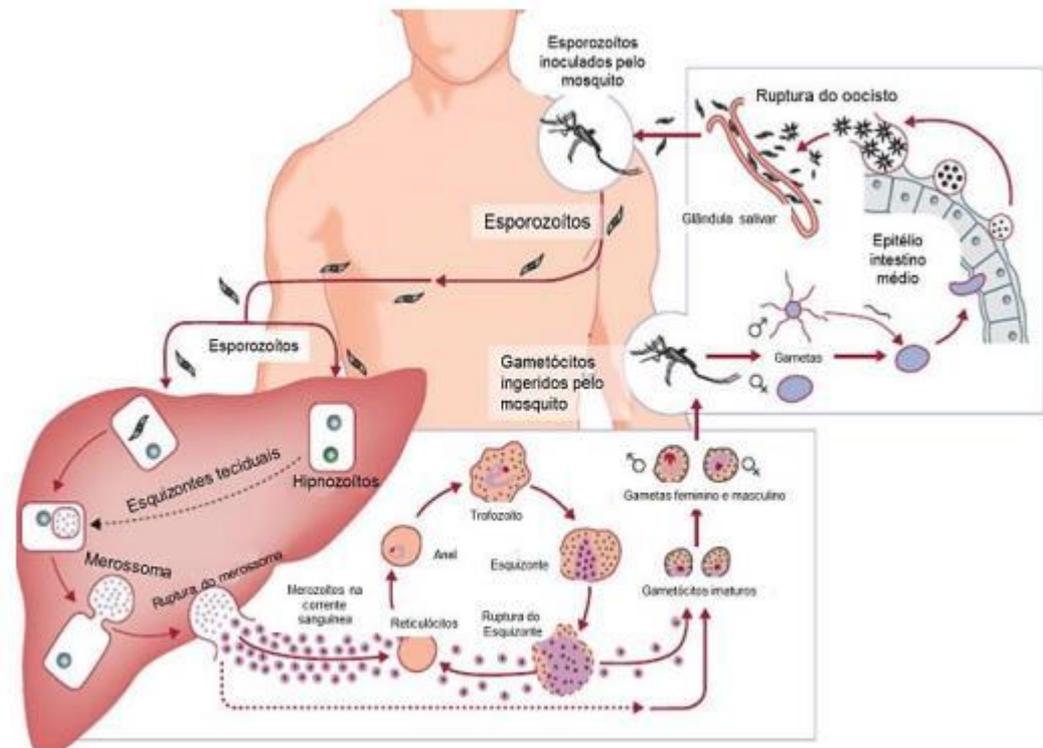
Fonte: Tham; Beeson; Rayner (2017).

A fase de esquizogonia tecidual diferencia os esporozoítos em trofozoítos exoeritrocíticos, que são capazes de se replicar rapidamente. Entre uma a duas semanas, as sucessivas divisões geram esquizontes hepáticos com milhares de merozoítos, que são liberados na corrente sanguínea dentro de vesículas denominadas merossomas, derivadas da membrana plasmática do hepatócito. Uma vez aderido na superfície do eritrócito, a espécie infectante libera proteínas das organelas apicais (grânulos densos, micronemas e róptrias) para facilitar a interiorização nos glóbulos vermelhos do sangue. Essa invasão é mediada pela Proteína 1 de Superfície do Merozoíto (MSP-1), que auxilia no reconhecimento da célula hospedeira e pelo Antígeno 1 de Membrana Apical do merozoíto (AMA-1), que realiza a justaposição do merozoíto na hemácia. O ciclo hepático do parasito é assintomático para o hospedeiro (Ashley *et al.*, 2018; De niz *et al.*, 2017; Lindner *et al.*, 2012).

Dentro das hemácias, o parasito se desenvolve por reprodução assexuada. Durante essa fase, ocorre a formação de trofozoítos jovens, trofozoítos maduros, esquizontes multinucleados e merozoítos sanguíneos, que são liberados para a circulação após o rompimento dos eritrócitos. Com a invasão de novas hemécias o ciclo se repete por sucessivas vezes. Esse ciclo é responsável pelos sinais clínicos da doença que ocorrem a cada 48 horas nas infecções por *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. ovale* ou 72 horas quando a espécie for *P. malariae*. Ao penetrar nas hemácias, alguns merozoítos podem se diferenciar em gametócitos masculino ou feminino, que serão ingeridos pelo mosquito durante o repasto sanguíneo dando continuidade ao ciclo. Esses vetores infectados são então responsáveis pela disseminação da doença (Ashley *et al.*, 2018; Phimpraphi *et al.*, 2008). A figura 4 abaixo ilustra todo o ciclo de vida do Plasmódio.

As espécies do gênero *Plasmodium* apresentam preferências ao tipo de eritrócito a ser infectado. *P. vivax* invade reticulócitos, ou hemácias jovens, ao passo que *P. malariae* e *P. knowlesi* preferem eritrócitos maduros. *P. falciparum* é a única espécie que, além de ser capaz de multiparasitar a mesma hemácia, não tem preferência para nenhum estado de maturação do eritrócito, o que pode ser considerado fator de virulência para esse parasito (Iyer *et al.*, 2007).

Figura 4 - Ciclo de vida dos plasmódios nos hospedeiros humano e invertebrado



Fonte: Adaptado de Mueller *et al.* (2009).

1.3 ASPECTOS CLÍNICOS DA MALÁRIA

As manifestações clínicas da malária podem ser classificadas como brandas, graves ou assintomáticas. A gravidade da doença é determinada por fatores do parasito e do hospedeiro. A carga parasitária e a espécie infectante são causas que independem do hospedeiro e contribuem para o desfecho da doença. A malária falciparum está comumente associada a casos graves da doença, principalmente quando em conjunto com uma alta carga parasitária. Do ponto de vista do hospedeiro, existem grupos de risco que são mais vulneráveis a desenvolver malária grave. Mulheres grávidas, crianças menores de 5 anos de idade, imunossuprimidos e viajantes vindos de regiões não endêmicas estão mais susceptíveis a

terem sintomas graves se infectados por *P. falciparum*. As outras espécies raramente causam doença grave (Crawley *et al.*, 2010; Phillips *et al.*, 2017).

A fase sintomática remete ao período de desenvolvimento intraeritrocítico da fase assexuada do parasito. Nesse contexto, após 10 a 15 dias de infecção pela picada do mosquito fêmea *Anopheles*, inicia-se a fase sintomática com sinais clássicos da doença: febre, calafrios e dor de cabeça. Os primeiros sintomas são inespecíficos e dificultam o diagnóstico da doença por ter similaridade com diversas outras doenças, especialmente arboviroses (Phillips *et al.*, 2017; Weinberg; Moon, 2009).

Durante o rompimento dos eritrócitos, substâncias tóxicas para o hospedeiro, como a hemozoína e o glicofosfatidilinositol (GPI), produtos do metabolismo do parasito, são liberados para circulação, induzindo a resposta imunológica. O sistema imunológico do hospedeiro reage com liberação por parte dos macrófagos de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral (TNF- α) e interleucinas-1 e 6. As citocinas produzidas estimulam a proliferação de progenitores hematopoéticos (linfócitos B, neutrófilos e monócitos) para combater o plasmódio. A inflamação sistêmica promove febre alta (IL-1 e IL-6) e calafrios, em um episódio conhecido como acesso malárico. Os parasitos se multiplicam de forma síncrona e esse ciclo febril se repete a cada 48 ou 72 horas, a depender da espécie. Outros sintomas que podem estar acompanhados durante essa fase são mal-estar, dor muscular, sudorese, náusea e tontura (Clark; Scofield, 2000; Phillips *et al.*, 2017).

O sistema imunológico do hospedeiro reconhece o parasito como corpo estranho e reage inicialmente com um perfil de resposta de células Th1, através da liberação das citocinas pró-inflamatórias visando controlá-lo. Com o decorrer da infecção, desenvolve-se a regulação da resposta pró-inflamatória com liberação de substâncias anti-inflamatórias, fundamental para o controle da patogenicidade. Entretanto, um desequilíbrio da resposta pró/anti-inflamatória pode ocorrer, com uma resposta exacerbada de citocinas pró-inflamatórias, contribuindo para o quadro grave da doença. Os casos de malária grave estão associados à infecção por *P. falciparum*, podendo gerar anemia grave, insuficiência renal aguda, complicações respiratórias e malária cerebral com comprometimento neurológico e, em último caso, óbito (Perry *et al.*, 2005; Phillips *et al.*, 2017; Wassmer; Grau, 2017).

A malária cerebral, que se manifesta com perda de consciência, convulsões e coma, pode levar ao óbito ou deixar sequelas neurológicas permanentes no indivíduo. Mesmo com tratamento adequado, a malária cerebral tem letalidade de 10 a 50% e acomete em uma frequência entre 0,01% a 16% os pacientes infectados. Cegueira, ataxia e hipotonia são sintomas que podem ser passageiros, entretanto, 25% dos indivíduos sofrem por sequelas de

longo prazo, alterando a função cognitiva e motora, além de afetar o comportamento e causar epilepsia. A malária é, portanto, também responsável por neurodeficiência em crianças africanas, elevando o índice de comorbidade entre os indivíduos infectados. Apesar do *P. falciparum* ser o maior responsável por esse quadro, nos últimos anos existem cada vez mais notificações de malária grave por *P. vivax*, sendo um alerta para outras regiões endêmicas não africanas que possuem essa espécie como principal agente etiológico (Alves *et al.*, 2007; Brewster *et al.*, 1990; Idro *et al.*, 2005; John *et al.*, 2010; Wassmer; Grau, 2017).

Em regiões endêmicas com área de transmissão intensa, a exposição contínua do plasmódio induz ao desenvolvimento da imunidade adquirida em parte da população. Nesses casos, a doença pode ser assintomática. O indivíduo mesmo na ausência de sintomas, apresenta parasitos circulantes e assume grande relevância no controle da doença, visto que são considerados como reservatório potencial para a disseminação da malária. Uma alternativa para combater o plasmódio em indivíduos considerados reservatórios da doença é a realização de busca ativa do parasito por equipes de saúde e apoio diagnóstico em regiões endêmicas com altas taxas de transmissão de malária (Ferreira, 2011).

1.4 QUIMIOTERAPIA ANTIMALÁRICA

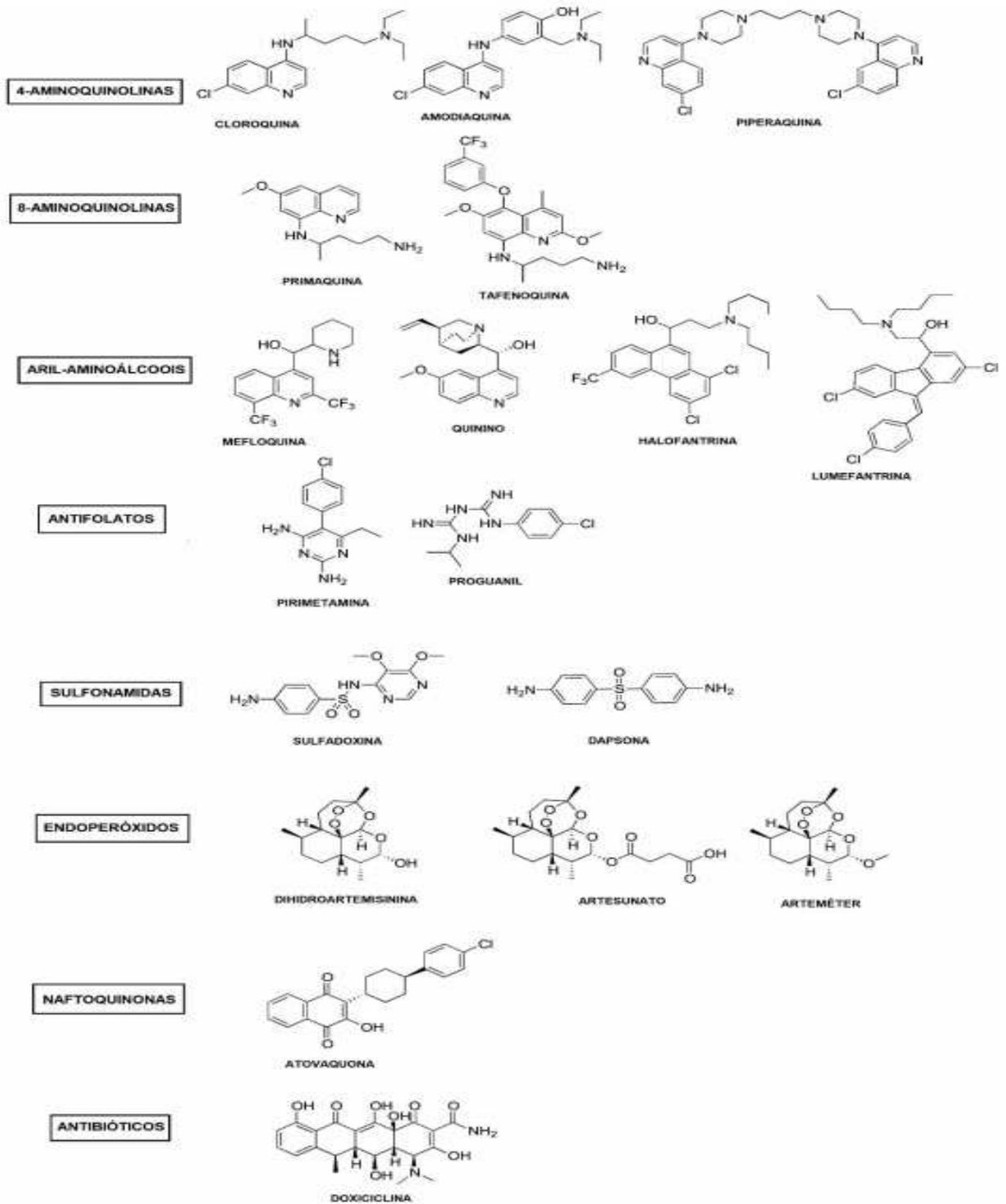
Em regiões endêmicas da malária na África Subsaariana, é comum que muitos pacientes sejam tratados apenas com base nos sintomas febris, o que resulta no uso excessivo e indiscriminado de medicamentos antimaláricos, levando ao desenvolvimento de resistência. Como parte dos esforços de erradicação da doença, as diretrizes atualizadas da OMS de tratamento (2015) recomendam que todos os casos suspeitos sejam confirmados por testes diagnósticos antes do início da terapia medicamentosa com intuito de reduzir a mortalidade e morbidade; garantir a cura e prevenir a progressão da doença para malária grave; reduzir a transmissão da doença e retardar o surgimento e disseminação de resistência aos antimaláricos (Who, 2015).

Historicamente, a partir da década de 40, os antimaláricos sintetizados ou de origem natural, começaram a ser utilizados para o tratamento de malária. Do ponto de vista do parasito, esses medicamentos podem atuar como esquizotocidas teciduais, esquizotocidas sanguíneos, gametocidas ou esporotocidas (França; Santos; Figueroa-Villar, 2008).

De acordo com a classificação química, os fármacos antimaláricos são classificados em 8 grupos: 4-aminoquinolinas (cloroquina), 8-aminoquinolinas (primaquina),

endoperóxidos semissintéticos (artemisinina), aril-aminoálcoois (quinina), naftoquinonas, antifolatos, sulfonamidas e antibióticos, conforme ilustrados na figura 7 (Rathod *et al.*, 2022).

Figura 5 - Classes química dos fármacos antimaláricos



Fonte: Adaptado de Rathod *et al.* (2022).

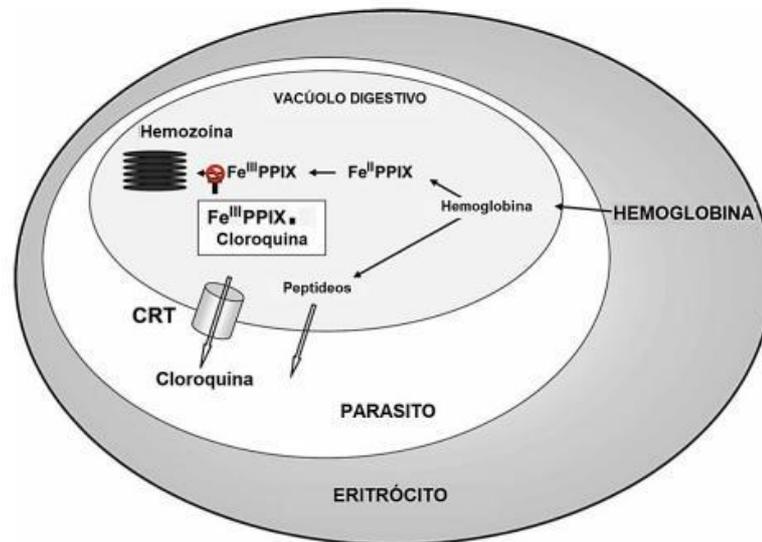
1.4.1 Principais antimaláricos utilizados na terapêutica

Em 1820 foi caracterizado, a partir da planta *Cinchona calisaya*, um alcaloide com potencial antimalárico denominado quinina. Cerca de 100 anos depois, após a primeira guerra mundial, diversos antimaláricos contendo o anel quinolínico como base foram desenvolvidos para terapia antimalárica. Dentre eles, o grupo das 4-aminoquinolinas (cloroquina) e 8-aminoquinolina (primaquina) foram produzidos (La-Scalea *et al.*, 2007).

A cloroquina, presente por 21 dias na circulação, é um esquizotocida sanguíneo e pertencente ao grupo das 4-aminoquinolinas, tendo sido por muito tempo o medicamento mais usado e eficaz para o tratamento de malária em todo o mundo. No entanto, devido a uma série de fatores como uso indiscriminado e tratamento incompleto, perdeu a eficiência para o tratamento da malária falciparum principalmente na África Subsaariana. Apesar disso, a cloroquina ainda é o medicamento de escolha para tratamento de malária não falciparum em países onde a resistência ainda é pouco evidente, como no Brasil. Entretanto, pacientes que fazem uso de cloroquina por longos períodos ou em altas dosagens correm riscos devido à alta toxicidade e devem fazer avaliação periódica oftalmológica e neurológica (Who, 2015).

As drogas pertencentes ao grupo das 4-aminoquinolinas, onde a cloroquina se enquadra, apresentam um mecanismo de ação capaz de inibir a formação de hemozoína em merozoítos jovens. O parasito degrada a hemoglobina, liberando o grupo heme (ferriprotoporfirina IX – Fe(II)PPIX), que é oxidado em Fe(III)PPIX. O acúmulo do grupo oxidado de ferroprotoporfirina no vacúolo digestivo do parasito induz estresse oxidativo e é considerado tóxico, podendo ser letal caso o plasmódio não consiga converter a Fe(III)PPIX em hemozoína (figura 6) (Kumar; Bandyopdhyay, 2005; Sherman, 1977; Silva *et al.*, 2005).

Figura 6 - Mecanismo de ação da cloroquina



Hemoglobina sendo degradada no vacúolo digestivo, produzindo peptídeos e ferriprotoporfirina IX (Fe(II)PIX); este último, que é depositado como polímero insolúvel de hemozoína, representa um prejudicial resíduo para o parasito. A cloroquina forma complexos com Fe(III)PIX que impedindo a formação de hemozoína. Em cepas resistentes à cloroquina, a droga é expelida do vacúolo digestivo pela ação de um transportador ligado à membrana chamado transportador de resistência à cloroquina (CRT).

Fonte: Schlitzer (2007).

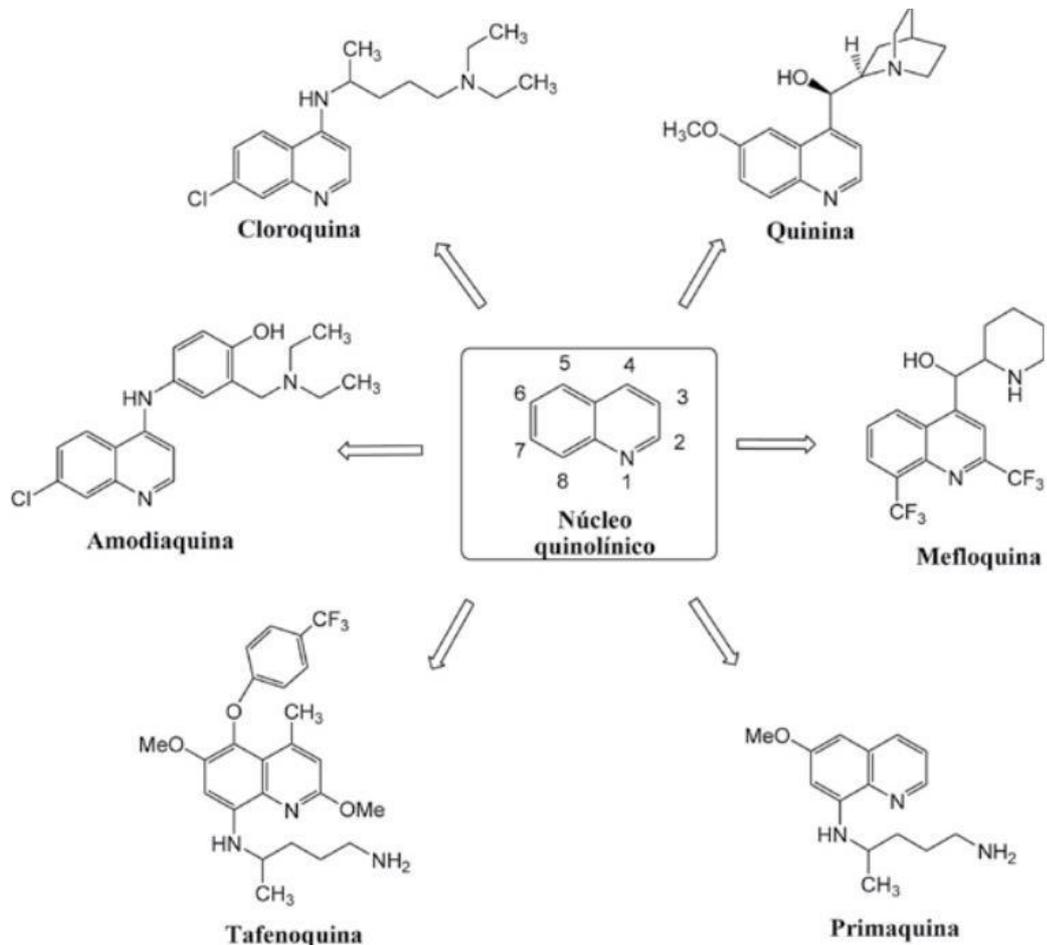
A primaquina é o destaque do grupo das 8-aminoquinolinas. Com ação contra hipnozoítos hepáticos e também gametocida, a primaquina é utilizada para prevenção de recaídas da doença para bloquear a transmissão da doença. É sempre utilizada em associação com um esquizotocida sanguíneo. Seu mecanismo de ação, apesar de não ser totalmente esclarecido, indica que a droga atua nas mitocôndrias interferindo no processo de geração de energia e gerando radicais livres tóxicos para o parasito. Já é relatado que indivíduo com deficiência na enzima glicose-6-fosfato desidrogenase pode evoluir para casos graves de anemia hemolítica, mesmo em uso da dose clássica. Também foi descrito que o uso de primaquina pode gerar efeito tóxico ao sistema hematopoiético, por oxidação de hemoglobina à metemoglobina (França; Santos; Figueroa-Avillar, 2008; Silva *et al.*, 2004; Ferreira; Gomes; Vieira, 2011).

No Brasil, está sendo gradualmente implementada a tafenoquina em dose única. Além de aumentar a adesão ao tratamento, o novo medicamento surge como opção para substituir a primaquina em casos de resistência confirmados (Ministério da saúde, 2022).

A mefloquina também foi sintetizada a partir do anel quinolínico. A partir dos anos 1980, esse esquizotônico sanguíneo com ativação maior do que a cloroquina, passou a ser prescrito como quimioprotetor em dose única, se mantendo na circulação por 14 dias. Entretanto, a mefloquina apresenta vários efeitos adversos indesejados, incluindo sintomas neurológicos, psiquiátricos e cardíacos. A alta toxicidade provocada limitou seu uso para ser apenas utilizado em combinação com outros antimaláricos para o tratamento de *P. falciparum* multirresistente (Patchen *et al.*, 1989; Who, 2006).

A figura 7 abaixo demonstra a relevância do estudo do anel quinolínico para o tratamento antimalárico, com exemplos de medicamentos sintetizados e comercializados a partir desse grupo.

Figura 7 - Medicamentos antimaláricos derivados do anel quinolínico



Fonte: Pinheiro; Bispo; Souza (2010).

A classe dos endoperóxidos foi descoberta na década de 1970. Através do estudo da planta *Artemisia annua*, pesquisadores chineses descobriram atividade antimalárica da

artemisinina, da classe dos sesquiterpenos. Sua lipoficilidade natural dificulta a solubilidade em água e modificações na molécula foram realizadas. Os produtos sintéticos, como o artesunato, arteméter e diidroartemisinina foram criados e são utilizados atualmente para o tratamento de malária (Packard, 2014; White, 2004).

Derivados da artemisinina são utilizados no tratamento de cepas resistentes de *Plasmodium*, incluindo casos de malária *falciparum* aguda. Sua meia vida curta necessita de uso prolongado do medicamento e, considerando na baixa adesão do paciente ao tratamento, a terapia combinada a base de artemisinina (ATC) foi implementada: utilização de fármacos com perfis farmacocinéticos distintos favorece a eliminação de parasitos que resistem a monoterapia, assim como diminui o tempo de tratamento e retarda o processo de resistência do parasito (White, 2008; Who, 2015).

De acordo com o Ministério da Saúde, no Brasil o tratamento para *P. vivax* e *P. ovale* é feito com cloroquina por 3 dias (10 mg/kg no primeiro dia e 7,5 mg/kg nos dias restantes) e primaquina (0,5 mg/kg/dia) por 7 dias, visando combater hipnozoítos e prevenir recaída da doença. Entretanto, gestantes, puérperas até 1 mês de lactação e crianças menores de 6 meses não podem utilizar primaquina, restringindo o tratamento para cloroquina por 3 dias e cloroquina profilática (5 mg/kg/dose/semana) para puérperas até 1 mês de aleitamento. Crianças de até 6 meses devem ser tratadas com ACTs. Para infecções por *P. malariae*, o tratamento é realizado com cloroquina por 3 dias (10 mg/kg no primeiro dia e 7,5 mg/kg nos dias restantes). O tratamento para malária *falciparum* associa artemeter e lumefantrina ou artesunato e mefloquina por 3 dias e primaquina em dose única (0,5 mg/kg) para eliminação de gametócitos. Infecções mista (*P. falciparum* +*P. vivax* ou *P. ovale*) o esquema utilizado é artemeter e lumefantrina ou artesunato e mefloquina, associados à primaquina por 7 ou 14 dias, caso haja recaída da doença após 7 dias do tratamento. Em caso de internação ou suspeita de malária grave, a utilização de artesunato intravenoso ou intramuscular é preconizada e quando o paciente se manter estável, utilizar o tratamento preconizado com base na espécie infectante (Ministério da saúde, 2021; Phillips *et al.*, 2017; White, 2013).

A tabela 1 abaixo lista os principais antimaláricos e seus respectivos alvos de ação utilizados na terapêutica, incluindo a classe das quinolonas, lactonassesquiterpênicas (artemisinina), aminoálcoois, sulfonamidas, biguanidas, diaminopirimidinas, naftoquinonas e antibióticos (Who, 2015).

Tabela 1 - Principais antimaláricos disponíveis e seus estágios alvo no parasito

| Antimalárico | Classificação Química | Estágios alvo no parasito | | | |
|---------------------|--|---------------------------|----|----|-----|
| | | GM | ER | HP | ESP |
| Amodiaquina | 4-aminoquinolina | | * | | |
| Cloroquina | | | * | | |
| Primaquina | 8-aminoquinolina | * | * | * | * |
| Tafenoquina | | | | * | |
| Arteméter | Endoperóxido semissintético (derivados de artemisinina) | * | * | | |
| Artesunato | | * | * | | |
| Dihidroartemisinina | | * | * | | |
| Quinina | | | * | | |
| Mefloquina | Aminoálcool | | * | | |
| Lumefantrina | | | | * | |
| Clorproguanil | Biguanidas | * | * | | |
| Proguanil | | * | * | | |
| Atovaquona | Naftoquinona | * | * | | |
| Piperaquina | Bisquinolina | * | * | | |
| Pirimetamina | Diaminopirimidina | * | * | | * |
| Sulfadoxina | Sulfonamida | * | * | | |
| Azitromicina | Antibiótico macrolídeo | | * | | |
| Clindamicina | Antibiótico lincosamidas | | * | | |
| Doxiciclina | Antibiótico Tetraciclina | | * | | |
| Tetraciclina | Antibiótico | | * | | |

GM – gametócitos; ER – formas eritrocíticas; HP – hipnozoítos; ESP – esporozoítos

Fonte: Tabela adaptada de Aguiar *et al.* (2012).

1.5 RESISTÊNCIA AOS ANTIMALÁRICOS

A capacidade do parasito em resistir e/ou se multiplicar apesar da administração de determinado medicamento em doses iguais ou superiores às recomendadas é um problema existente há muito tempo no tratamento de malária, fenômeno conhecido como resistência antimalárica. As causas mais conhecidas para o aparecimento da resistência são: 1) surgimento de mutações gênicas que conferem resistência a determinado antimalárico; 2) a seleção natural de cepas resistentes a determinado medicamento quando ele é capaz de eliminar apenas cepas

sensíveis, fenômeno facilitado pelo uso irracional de antimaláricos. Como consequência, as infecções resistentes têm maior chance de se agravar uma vez que a resposta ao tratamento se torna mais lenta e ineficaz (White, 2004; Who, 2011).

Para entender a rápida capacidade de adquirir resistência aos antimaláricos, sobretudo *P. falciparum* que adquiriu resistência a praticamente todos antimaláricos utilizados na terapêutica, foi necessário um estudo detalhado de seu genoma. Para as classes dos antifólicos e sulfonamidas foi identificada a natureza das mutações em *P. falciparum*: alterações nos genes dihidrofolato redutase e dihidro pterato sintetase são associados à resistência observada para esses compostos. Esse estudo foi confirmado com amostras da Região Amazônica do Brasil (Silva; Oliveira, 2002; Vasconcelos, 2000).

A identificação de relações gênicas com a resistência à cloroquina também foi estudada em *P. falciparum*. Os genes *mdr* (multi-drug-resistance) de *P. falciparum* *pfmdr1* e *pfmdr2* foram homólogos aos genes *mdr* de células tumorais multirresistentes a drogas por mecanismo de efluxo acelerado. Os resultados demonstram que a glicoproteína Pgh-1, codificada por *pfmdr1*, atua como modeladora de absorção-secreção da cloroquina em ensaios *in vitro* (Cowman, 1991; Silva, 2002).

P. falciparum também apresenta o gene CRT transportador, que codifica uma proteína na membrana do vacúolo digestivo do parasito. Essa proteína (transportador de resistência à cloroquina) contribui para o mecanismo de evasão de drogas do parasito e tem papel fundamental na resistência aos antimaláricos (Huang, 2016).

A resistência antimalárica teve seus primeiros relatos na década de 1950, com a cloroquina no sudeste asiático (1957) e na América do Sul (1959). A resistência foi reportada para *P. falciparum* e atingiu África Subsaariana algumas décadas depois (1978) e já nos anos 1990 foi disseminada para todas as áreas endêmicas africanas (Ridley, 2002; Young; Moore, 1961).

Em 1960, foram relatados casos de sensibilidade reduzida do *P. falciparum* à quininas no Sudeste Asiático, América do Sul e região endêmica africana. Foi observado que não existe relação na perda de sensibilidade de quinina com cloroquina ou mefloquina, sugerindo mecanismos diferentes de resistência (Pradines *et al.*, 2010).

Um ano após ser introduzida, em 1967, a terapia de sulfadoxina e pirimetamina já teve relatos de resistência no Camboja, Tailândia e pouco tempo depois em toda África e Sudeste Asiático. Caso similar ocorreu com a mefloquina no início da década de 1990 no Camboja. Posteriormente, foi confirmada resistência também no sudeste asiático, na África e América do Sul, incluindo a região do Amazonas, no Brasil (Achan *et al.*, 2018; Price *et al.*, 2004).

A resistência à mefloquina foi observada no início da década de 1990 na fronteira com o Camboja tailânde, Sudeste Asiático e em menor frequência nas regiões endêmicas da África e América do Sul (Price *et al.*, 2004).

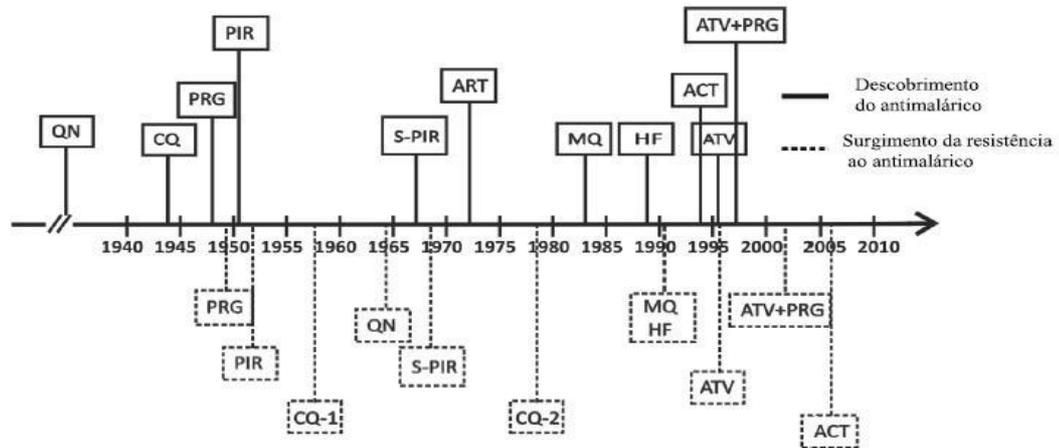
Existem relatos de casos de resistência após 10 anos da introdução de atovaquona como monoterapia. A associação com proguanil também resultou em cepas resistentes registradas em 2002. Para *P. falciparum* também há registro de resistência a outros medicamentos antimaláricos, como amodiaquina, halofantrina, lumefantrina, piperquina e, mais recentemente, derivados de artemisinina (Dondorp, 2012; Eastman *et al.*, 2011; Noedl *et al.*, 2008).

Em 2008, no Camboja, os primeiros casos de resistência às ACTs foram relatados. Atualmente, a resistência às ACTs para malária *falciparum* já está disseminada no sudeste asiático (Ouji *et al.*, 2018).

No Brasil, assim como na América Latina, existem casos relatados de *P. vivax* resistentes à cloroquina desde 1996. As primeiras notificações em território brasileiro são oriundas de Manaus, região oeste da Floresta Amazônica. Contudo, ainda não foi definido até que ponto *P. vivax* CQ-resistente representa uma ameaça às diretrizes de controle da malária na América Latina. Para a malária *falciparum*, os casos de resistência à cloroquina, pirimetamina mais sulfadoxina está bem estabelecida. Dessa forma, a escolha de tratamento para esse tipo de malária é feita com associação de derivado de artemisinina e lumentrafina (Gonçalves *et al.*, 2014; Marques *et al.*, 2014).

A figura 8 abaixo sintetiza cronologicamente a descoberta e os casos de resistência aos antimaláricos para *P. falciparum* ao redor do mundo (Pradines *et al.*, 2010).

Figura 8 - Descoberta e resistência aos antimaláricos por *P. falciparum*



QN = Quinina; CQ = Cloroquina; CQ-1 = Resistência à Cloroquinano Sudeste Asiático e América do Sul; CQ-2 = Resistência à Cloroquina na África; PRG = Proguanil; S-PIR = SulfadoxinaPirimetamina; ART = Artemisinina; MQ = Mefloquina; HF = Halofantrina; ACT = Terapia combinada com artemisinina; ATV = Atovaquona+Proguanil.

Fonte: Souza (2015).

Atualmente no Brasil, a resistência aos antimaláricos foi observada em três espécies: *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. malariae*. A resistência ao medicamento determina até quando será utilizado no mercado e a necessidade de uma constante renovação terapêutica é essencial para o tratamento efetivo da malária ao redor do mundo (Who, 2011; Zofou, 2011).

2 JUSTIFICATIVA

Apesar dos esforços empreendidos pelos programas de controle e erradicação da malária desenvolvidos pela Organização Mundial da Saúde e dos progressos alcançados nesse domínio, a doença mantém-se como uma das principais questões de saúde pública global. Em 2021, foram registrados 247 milhões de casos clínicos e 619 mil mortes em todo o mundo. A detecção precoce e precisa, juntamente com o tratamento rápido e apropriado, figura como a medida primordial de controle da doença, uma vez que as vacinas criadas não obtiveram taxas de eficácia satisfatórias. A emergência e propagação generalizada de resistência aos antimaláricos disponíveis, inclusive aos protocolos de tratamento mais recentes, têm alertado os programas globais de controle da doença, justificando, assim, a necessidade contínua de busca por novas moléculas seguras e eficazes para o tratamento da malária (Noedl *et al.*, 2008; Woodrow; White, 2017).

O estudo trabalha a hipótese do uso de derivados sintéticos aminoquinolínicos com atividade antimalárica e potencial uso terapêutico. Para a validação do potencial antimalárico, o presente trabalho visa avaliar a atividade antiplasmodial *in silico*, *in vitro* e *in vivo* de 16 novas moléculas contendo o anel quinolínico.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar *in silico*, *in vitro* e *in vivo*, a atividade antimalárica de novos compostos aminoquinolínicos sintéticos

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Determinar, *in silico*, as propriedades físico-química e farmacocinéticas de absorção dos compostos do estudo;
- 2) Realizar, *in silico*, o docking molecular dos compostos para identificar o possível alvo de interação;
- 3) Avaliar, *in vitro*, a citotoxicidade dos compostos testados em células de fibroblasto pulmonar humano (WI);
- 4) Determinar, *in vitro*, a atividade esquizonticida dos compostos testados em cepas cloroquina-resistente de *Plasmodium falciparum* (W2);
- 5) Determinar o índice de seletividade dos compostos;
- 6) Avaliar, *in vivo*, a atividade antiplasmodial dos compostos mais promissores;
- 7) Avaliar a toxicidade do composto mais promissor por meio de análise bioquímica de enzimas hepáticas e renais;
- 8) Avaliar a histologia dos rins, intestino e fígado de animais testados com o composto mais promissor;
- 9) Determinar possível mecanismo de ação do composto mais promissor.

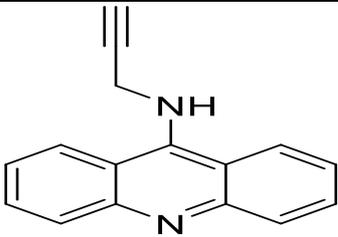
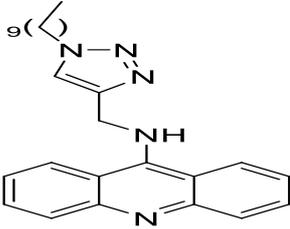
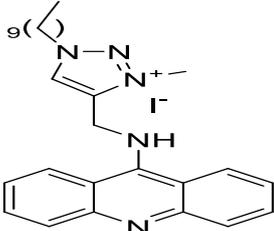
4 MATERIAIS E MÉTODOS

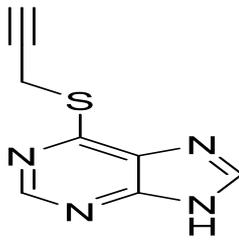
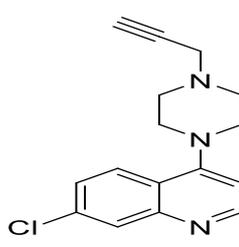
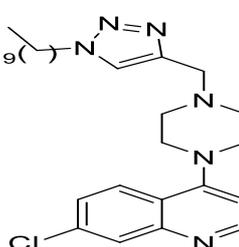
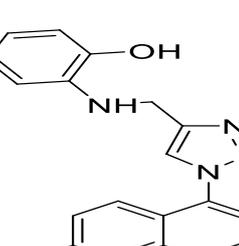
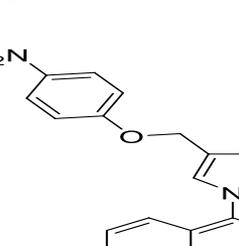
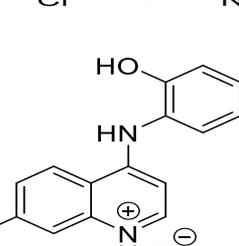
4.1 OBTENÇÃO DOS COMPOSTOS SINTÉTICOS

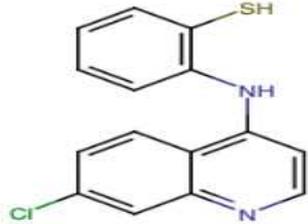
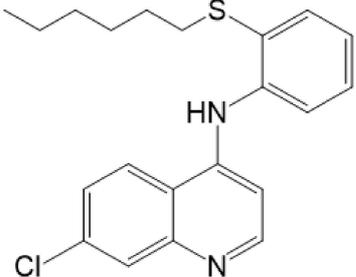
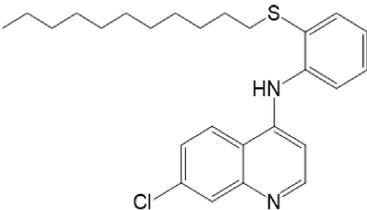
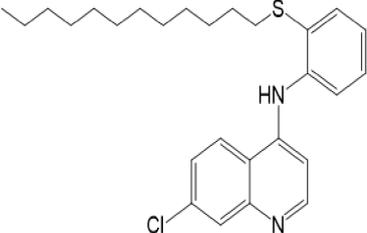
Dezesseis moléculas (Tabela 2) derivadas do anel quinolínico foram disponibilizadas para testes *in vitro* de atividade antiplasmodial. Os compostos foram sintetizados pelo grupo do Dr. Adilson David da Silva do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Juiz de Fora.

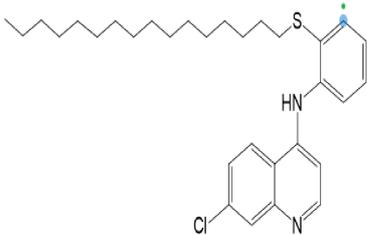
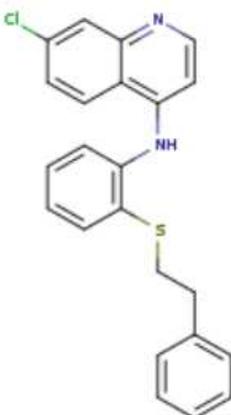
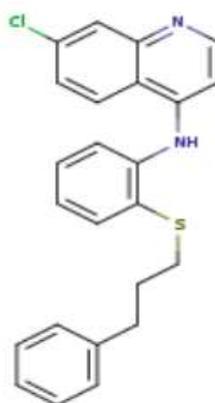
As moléculas foram diluídas em 5% de dimetilsulfóxido (DMSO Sigma-Aldrich®, EUA) e armazenadas em geladeira (2 a 8°C).

Tabela 2 - Derivados aminoquinolínicos sintéticos

| Código | Estrutura | Massa molar (g/mol) | Fórmula molecular |
|--------|---|---------------------|---|
| 1 |  | 232,1 | C ₁₆ H ₁₂ N ₂ |
| 2 |  | 415,3 | C ₂₃ H ₃₃ N ₅ |
| 3 |  | 557,2 | C ₂₇ H ₃₃ I ₂ N ₅ |

| | | | |
|---|---|--------|--|
| 4 |  | 190,0 | C ₂₇ H ₃₃ N ₅ S |
| 5 |  | 285,1 | C ₁₆ H ₁₆ ClN ₃ |
| 6 |  | 468,3 | C ₂₆ H ₃₇ ClN ₆ |
| 7 |  | 351,09 | C ₁₈ H ₁₄ ClN ₅ O |
| 8 |  | 381,06 | C ₁₈ H ₁₂ ClN ₅ O ₃ |
| 9 |  | 339,22 | C ₁₅ H ₁₁ Cl ₃ N ₂ O |

| | | | |
|----|---|--------|----------------------|
| 10 |  | 286,78 | $C_{15}H_{11}ClN_2S$ |
| 11 |  | 370,94 | $C_{21}H_{23}ClN_2S$ |
| 12 |  | 441,07 | $C_{26}H_{33}ClN_2S$ |
| 13 |  | 455,10 | $C_{27}H_{35}ClN_2S$ |

| | | | |
|----|---|--------|--|
| 14 |  | 511,20 | C ₃₁ H ₄₃ ClN ₂ S |
| 15 |  | 390,93 | C ₂₃ H ₁₉ ClN ₂ S |
| 16 |  | 404,95 | C ₂₄ H ₂₁ ClN ₂ S |

4.2 AVALIAÇÃO *IN SILICO* DE PARÂMETROS FÍSICO QUÍMICOS E FARMACOCINÉTICOS

Todas as moléculas foram avaliadas através da plataforma SwissADME quanto às propriedades físico-químicas e farmacocinéticas de absorção. A avaliação *in silico* permite prever a biodisponibilidade oral do fármaco, seguindo a regra dos 5 de Lipinski que leva em consideração o peso molecular, número de doadores e aceptores de ligações de hidrogênio, coeficiente de partição de consenso (ClogP). A predição de absorção pelo epitélio intestinal

humano (HIE) e barreira hematoencefálica (BHE) também foi feita pela mesma plataforma (Daina *et al.*, 2017; Lipinski *et al.*, 1997).

4.3 REALIZAÇÃO, *IN SILICO*, O DOCKING MOLECULAR DOS COMPOSTOS PARA IDENTIFICAR O POSSÍVEL ALVO DE INTERAÇÃO

O estudo do docking molecular foi realizado junto ao grupo do professor Fernando Pilla Varotti (UFSJ, Divinópolis).

As estruturas tridimensionais dos ligantes foram inicialmente criadas através do software Marvin Beans 16.8.1.0 (ChemAxon, Budapeste, Hungria) no formato PDB. A protonação e a presença de tautômeros foram rigorosamente avaliadas utilizando pH 7,4 e pH 4,0. Posteriormente, todos os ligantes foram refinados utilizando o Método Semiempírico Paramétrico 7 através do software MOPAC2012, empregando a rotina Eigenvector Follow para minimização. Os ligantes refinados no formato PDBQT foram então ajustados em relação às ligações rotativas e cargas atômicas pelo método de Gasteiger-Marsili, com os hidrogênios polares sendo retidos utilizando o programa MGLTools . A geometria dos ligantes foi visualmente inspecionada utilizando o programa Discovery Studio Visualizer (Elokely; Doerksen, 2013; Gasteiger; Marsili, 1980; Morris *et al.*, 2009; Stewart, 2013).

Após a preparação dos ligantes, foram conduzidas duas séries de cálculos de docking molecular utilizando o software AutoDock Vina (The Scripps Research Institute, Califórnia, EUA), acoplado à plataforma Octopus. Uma série de cálculos considerou o ajuste do estado de protonação dos compostos para pH 7,4, compatível com o pH do ambiente enzimático da maioria dos alvos, enquanto a outra série foi ajustada para pH 4,0, para os alvos 1LF3, 2ANL, 3BPF, 3FNU e 3QS1, localizados no vacúolo digestivo do parasito (Asojo *et al.*, 2003; Bhaumik *et al.*, 2011; Clemente *et al.*, 2006; Kerr *et al.*, 2009; Maia *et al.*, 2017; Trott; Olson, 2010). Em seguida, a energia de ligação resultante do docking molecular para cada composto foi utilizada para avaliação dos resultados. Subsequentemente, foi conduzida uma comparação da energia dos ligantes cristalográficos de cada um dos alvos. Os derivados aminoquinolínicos que demonstraram valores de energia mais baixos em relação ao ligante cristalográfico foram classificados como mais ativos pelos métodos *in silico*.

No Brazilian Malaria Molecular Targets (BraMMT) estão catalogados 35 alvos moleculares de *P. falciparum*, o que permite caracterizar e validar estudos *in silico* de novos compostos que tenham atividades contra diferentes alvos no parasito (Nunes *et al.*, 2019).

O BraMTT é considerado o primeiro banco de alvos moleculares pertencente ao *P. falciparum* apropriado para aplicar a técnica de triagem virtual baseada na estrutura do receptor. Através do BraMMT é possível selecionar alvos moleculares apropriados para moléculas promissoras, além de prever mecanismos de ação para novas moléculas (Nunes *et al.*, 2019).

Sendo assim, o BraMMT pode ser utilizado para direcionar a síntese de novas moléculas com potencial ação antimalárica, além de orientar no reposicionamento de novos fármacos. Para os compostos que fazem parte desse estudo a triagem foi realizada em triplicata através do MolAr -BR512018052442-7 contra o BraMMT (Marques *et al.*, 2019).

4.4 AVALIAÇÃO IN VITRO: CITOTOXICIDADE E ATIVIDADE ANTIPLASMODIAL

Células de fibroblasto pulmonar humano WI 26VA4 (ATCC CCL-95.1) foram cultivadas em meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado e mantidas em atmosfera de 5% de CO₂ a uma temperatura de 37°C (Costa Júnior *et al.*, 2021).

Para avaliar a citotoxicidade dos compostos foi utilizado o ensaio brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT), previamente descrito em (Costa Júnior *et al.*, 2021; Valsalam *et al.*, 2019). Os compostos foram diluídos em concentrações variando de 100 a 0,1 Mm. O experimento realizado consiste em uma análise colorimétrica baseada na conversão do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) para formazan, catalisada pela atividade da enzima succinil-desidrogenase, a qual é presente na mitocôndria das células viáveis, conforme descrito por Mosmann em 1983. Esse procedimento permite a quantificação do número de células vivas.

Para a condução deste experimento, uma suspensão celular foi preparada e ajustada para uma concentração de 10⁵ células por mililitro. Em seguida, 100µL desta suspensão foram adicionados a cada poço de uma microplaca de 96 poços da marca Corning (EUA), resultando em uma concentração final de 10⁵ células por poço. As células foram então incubadas a 37°C em uma estufa de CO₂ por um período de 24 horas para permitir a adesão.

Após esse período, os poços foram cuidadosamente lavados com solução salina tamponada estéril (PBS 1X). Os compostos a serem testados foram diluídos em meio de cultivo contendo 1% de soro fetal bovino (SFB) para alcançar concentrações de 100, 10, 1 e 0,1 mM, e foram adicionados à placa. Após 48 horas de incubação, os poços foram novamente lavados com PBS 1X, e então adicionou-se 100µL de uma solução de MTT (brometo de 3-

(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) a uma concentração de 5mg/mL, diluída em meio RPMI completo. A placa foi então incubada por 3 horas em temperatura ambiente. Em seguida, o sobrenadante foi removido e 50µL de dimetilsulfóxido (DMSO) foram adicionados a cada poço para solubilizar os cristais de formazan.

A leitura de placa foi realizada no espectro de 540 nm (Varioskan™ LUX multimode microplate reader). Todo o procedimento foi realizado em duplicata. O cálculo da concentração que reduz a viabilidade celular em 50% (CC₅₀) foi obtida por meio de um gráfico de curva concentração-resposta utilizando o software GraphPad Prism (versão 5.0).

Para o ensaio de atividade antiplasmodial, foi utilizada a cultura da cepa W2 (cloroquina resistente) de *P. falciparum* foi mantida. O cultivo foi procedido conforme as condições descritas por Trager e Jansen (1976), com algumas modificações. Para o crescimento da cultura, foi utilizado o meio RPMI 1640 (HEPES 25 mM, L-glutamina 2 mM, 40 µg/ml de gentamicina e 100 µl de hipoxantina) suplementado com 1% de albumax (Sigma) 2% de hematócrito. Os frascos contendo os parasitos foram mantidos a 37° C, sob atmosfera de 5% de CO₂, 5% de O₂ e 90% de N₂.

Os compostos foram então submetidos à avaliação da atividade antiplasmodial *in vitro* através da técnica de SYBR Green I conforme descrito em literatura (Vossen *et al.*, 2010). Para os experimentos, foram empregados cultivos de parasitos com predominância de estágios de anel. Em uma placa de 96 poços da marca Corning (EUA), foram adicionados 180µL de cultura sincronizada de *P. falciparum* por poço, com uma parasitemia de 0,5% em estágio de anel e hematócrito de 2%. Os compostos em teste foram adicionados à placa em triplicata, em volumes de 20µL por poço, em diferentes concentrações variando de 10 a 0,0001 µM. Os poços de controle contiveram hemácias infectadas sem adição dos compostos em teste (controle negativo), enquanto a cloroquina e o artesunato foram utilizados como antimaláricos padrão em todas as séries de experimentos, nas diluições seriadas dos compostos em teste (controle positivo). Em seis poços, foram adicionados 180µL de eritrócitos não parasitados para excluir a autofluorescência dos mesmos. Todos os testes foram conduzidos em triplicata.

Em seguida, as placas de teste foram incubadas a 37°C em uma mistura gasosa contendo 5% de O₂, 5% de CO₂ e 90% de N₂, por um período de 48 horas. Para avaliar a sensibilidade dos parasitos aos compostos, o teste de fluorescência foi realizado. Após a incubação, o sobrenadante foi removido e adicionados 150µL de PBS 1X em cada poço. As placas foram então centrifugadas a 700G por 5 minutos, o sobrenadante foi novamente removido e 120µL de tampão de lise contendo Sybrgreen (20mM TRIS-base, 5mM EDTA,

0,008% p/v de saponina, 0,08% v/v de Triton X-100, 0,2µL/mL de Sybrsafe) foram adicionados.

Após a lise dos eritrócitos, os poços foram homogeneizados e 100µL do conteúdo de cada poço foram transferidos para uma nova placa contendo 100µL de PBS e 0,2µL de SYBR Green I da marca Sigma Aldrich (USA). A leitura da fluorescência foi realizada após incubação por 30 minutos em temperatura ambiente, protegida da luz, utilizando um fluorímetro com excitação a 484nm e emissão a 535nm (Varioskan™ LUX multimode microplate reader). Para obter a concentração inibitória que reduz o crescimento do parasito em 50% (IC₅₀), o IC₅₀ foi obtido por meio de um gráfico de curva concentração-resposta utilizando o software GraphPad Prism (versão 5.0) para valores de $p < 0,05$. Todo o procedimento foi realizado em triplicata.

Para obter a concentração inibitória que reduz o crescimento do parasito em 50% (IC₅₀), o IC₅₀ foi obtido por meio de um gráfico de curva concentração-resposta utilizando o software GraphPad Prism (versão 5.0). Todo o procedimento foi realizado em triplicata.

O índice de seletividade (IS) foi calculado pela razão entre CC₅₀ e IC₅₀. Valores acima de 10 caracterizam moléculas com baixa citotoxicidade e, ao mesmo tempo, altamente seletivas para o parasito. Os compostos com os melhores resultados de IC₅₀ e IS foram selecionados para testes *in vivo* usando o modelo animal murino (Bell *et al.*, 1990; Katsuno *et al.*, 2015).

4.5 AVALIAÇÃO IN VIVO DA ATIVIDADE ANTIMALÁRICA

Para a realização do experimento *in vivo* foram utilizadas fêmeas de camundongos C57BL/6, com 6 a 8 semanas de idade, fornecidos pelo Centro de Biologia da Reprodução (CBR) CIAEP 02.0048-2019 – Universidade Federal de Juiz de Fora. Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com os preceitos éticos e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob o protocolo nº 06/2022.

Durante os experimentos, os animais foram mantidos em armários climatizados ALESCO® com controle de fluxo de ar, temperatura estabilizada de 22°C ± 2 e garantindo o ritmo circadiano do animal utilizando o ciclo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro todos os dias. Comida padrão para roedores e água foram disponibilizadas *ad libitum*. Foi estabelecido o máximo de 5 animais/gaiola. Todo o experimento foi assistido pelo responsável técnico e veterinário do biotério, seguindo as diretrizes de manejo dos animais de laboratório (NRC, 2011).

O protocolo utilizado consiste em realizar a infecção de camundongos com a cepa de *Plasmodium berghei* NK65 via injeção intraperitoneal contendo 10^5 hemácias parasitadas (pRBCs) provenientes de camundongos doadores previamente infectados. Os animais foram divididos em 5 grupos experimentais: infectado sem tratamento, tratado com cloroquina 10 mg/kg e três grupos tratados com os três compostos mais promissores selecionados nos ensaios *in vitro* na dose de 15 mg/kg e 50 mg/kg. Foi realizado o modelo supressivo de tratamento, que consiste na administração do composto teste quatro horas após a infecção dos animais, seguido de mais quatro dias de tratamento consecutivos. O tratamento foi feito via oral por gavagem de 200 microlitros do composto teste diluído em água, conforme orientações do químico responsável (Jiang *et al.*, 2020; Peters, 1965; Torre *et al.*, 2018).

Para monitoramento da eficácia do tratamento, esfregaços de sangue foram confeccionados a partir do quarto dia pós infecção dos camundongos e a parasitemia foi verificada diariamente até o décimo dia. Para isso, foi coletada uma gota de sangue da veia caudal de cada animal. Os esfregaços sanguíneos foram preparados, fixados em metanol, corados com o corante hematológico Giemsa (Doles), e posteriormente analisados microscopicamente em aumento de 100x. O composto testado foi considerado eficaz quando a parasitemia foi reduzida em pelo menos 30% (Carvalho, 1991).

O cálculo da inibição da multiplicação do parasita (IMP) no modelo *in vivo* é feito pela fórmula $[(A-B)/A] \times 100$, onde A corresponde aos camundongos infectados e sem tratamento e B ao grupo tratado. Este cálculo foi realizado todos os dias (começando no dia 4 pós-infecção, até o dia 10 pós-infecção).

Os testes em modelo animal foram realizados nos 3 compostos com melhor atividade antiplasmodial *in vitro*.

4.6 DOSAGEM SOROLÓGICA DOS ANIMAIS TRATADOS

A avaliação da toxicidade hepática e renal dos compostos foi realizada através de análise sorológica, utilizando marcadores de uréia e creatinina para função renal e as enzimas transaminase oxalacética (TGO) e transaminase pirúvica (TGP) para função hepática (Labtest Diagnostica®, Belo Horizonte). Para avaliar a toxicidade do medicamento nesses órgãos dos camundongos, o soro dos animais tratados, porém não infectados, foi coletado 24 horas após a finalizaçãodo tratamento (6º dia), e comparado a animais controle (não tratado e também não infectado). A coleta do sangue para obtenção do soro foi feita através de punção cardíaca.

Após a centrifugação a 500G, o soro foi armazenado a -80 °C até o momento do uso (Sodré; Costa; Lima, 2007; Kevin *et al.*, 2022).

4.7 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DOS ANIMAIS TRATADOS

Após a obtenção do soro conforme descrito no item 4.6, a eutanásia dos animais foi realizada com associação de xilazina 1% e quetamina 5% via intraperitoneal. A laparotomia foi realizada para coleta de órgãos. Fígado, rim e uma porção do intestino delgado foram fixados em formaldeído 10% para posterior inclusão em análise histológica.

Após 24h de fixação, os tecidos foram transferidos para uma solução de álcool 70%, dando início ao processamento histológico. Após 30 minutos de imersão os tecidos foram transferidos para concentrações graduais de etanol (80%, 90%, 100%, 100% e 100%), recebendo, ao final, três imersões em etanol 100% para promover a completa desidratação do tecido. Após a desidratação realizou-se a diafanização do tecido através de três imersões de 20 minutos no solvente orgânico xilol. Posteriormente, os tecidos receberam três banhos em parafina para posterior inclusão e formação dos blocos.

Os blocos confeccionados foram submetidos à microtomia de 5µm de espessura para confecção das lâminas, as quais foram coradas por Hematoxilina-Eosina (HE). Brevemente, as lâminas foram armazenadas, por 15 minutos, em estufa a 60°C para iniciar o processo de desparafinização. Posteriormente, essas lâminas foram submersas em xilol por 5 minutos para completa remoção da parafina impregnada no tecido. Esse processo foi repetido por três vezes. Logo após a desparafinização iniciou-se o processo de hidratação do tecido, para prepará-lo para receber o corante aquoso. Para tal, as lâminas foram submersas, durante 5 minutos, em concentrações alcoólicas decrescentes (100%, 90%, 80% e 70%) e logo após foram coradas com a hematoxilina por 5 minutos. Após a coloração as lâminas foram lavadas em água corrente por 15 minutos para promover a viragem do corante de vermelho para azul. Em seguida, após a remoção do excesso de água, as lâminas passaram por processo de desidratação para receber o próximo corante. Para tal, as lâminas foram submersas, durante 5 minutos, em graduações alcoólicas crescentes (70%, 80%, 90% e 100%) e em seguida foram coradas com a eosina por 3 minutos e lavadas, rapidamente, em álcool absoluto para remover o excesso de corante. Logo após procedeu-se a diafanização dos tecidos através de três banhos de cinco minutos em xilol e a montagem das lâminas com aplicação da resina e lamínula.

A análise da histopatologia dos órgãos dos animais foi realizada em microscópio óptico (AX10, Zeiss) em lentes de aumento 40X e 100X para observação geral das alterações histopatológicas.

4.8 INTERAÇÃO DO COMPOSTO COM A FERRIPROTOPORFIRINA

A constante de associação do composto 9 com a ferriprotoporfirina IX (Fe(III)PPIX) foi medido conforme descrito por Marinho et al., 2021. Um estoque solução de hemina foi preparada dissolvendo 3,5 mg de hemina em 10 mL de DMSO. A solução de Fe(III)PPIX (pH = 7,5) em DMSO aquoso (40% v/v) foi preparada com 140 mL de solução estoque de hemina, 3,86 mL de DMSO, 1 mL de tampão Tris 0,2 M ((Tris(hidroximetil)aminometano), pH 7,5) e água desionizada destilada até um total volume de 10 mL. Uma solução 0,3 mM de composto 9 foi preparada usando o mesma relação água:tampão:DMSO. A solução em branco também foi preparada usando a mesma proporção água:tampão:DMSO, mas sem hemina ou composto teste. A titulação foi realizada adicionando 20 mL alíquotas da solução composto 9 para 2 mL da solução Fe(III)PPIX e medindo os espectros UV-Vis após cada adição. Alíquotas de 20 mL de composto 9 também foram adicionados à solução branco em cada etapa, a fim de subtraia a absorbância do composto. As leituras de absorbância foram registrados em 402 nm (banda Soret) na presença e ausência do composto 9. O mesmo procedimento foi realizado para determinar a constante de associação da cloroquina.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística não paramétrica foi escolhida para os experimentos, utilizando o teste “t” de Student para um grupo populacional $n < 10$. Valores encontrados para $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente distintos. As análises foram feitas por meio do software GraphPad Prism 5.0 para Windows.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 AVALIAÇÃO IN SILICO DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICA E FARMACOCINÉTICAS DE ABSORÇÃO DOS COMPOSTOS

O teste *in silico* dos compostos prediz os resultados da biodisponibilidade oral, bem como a probabilidade dos fármacos atravessarem a barreira hematoencefálica e o trato gastrointestinal. Todos os resultados foram expressos em probabilidade de ocorrência do evento, calculada pela plataforma SwissADME. Para a seleção dos compostos, a escolha foi baseada nos melhores dados farmacocinéticos, a partir da biodisponibilidade, e também com base na probabilidade do composto atravessar as barreiras gastrointestinal e hematoencefálica. Seguindo a regra dos 5 de Lipinski que preconiza massa molecular (MM) < 500, número de doadores ≤ 5 , número de aceptores de ligações de hidrogênio ≤ 10 e coeficiente de partição óleo/água $\log P \leq 5$. Os resultados da predição *in silico* dos compostos teste são demonstrados abaixo (**Tabela 3**).

O conceito de "druglikeness" representa uma abordagem qualitativa fundamental no design de fármacos, utilizado para avaliar a similaridade de uma substância com características farmacológicas em relação a fatores críticos, como biodisponibilidade. A determinação da "druglikeness" é frequentemente realizada por meio da análise estrutural molecular de compostos, utilizando-se softwares especializados durante a fase de triagem *in silico*. Para este propósito, a molécula em questão deve satisfazer critérios básicos de semelhança com fármacos (drug-like), sendo preferencialmente conforme com os parâmetros estabelecidos pela "regra dos cinco" de Lipinski (Katsuno *et al.*, 2015; Lipinski, 1997; Tian *et al.*, 2015; Urso *et al.*, 2011).

De acordo com a recomendação, os compostos 3, 13, 14 e 16 foram excluídos dos testes *in vivo* por apresentarem infrações às regras de Lipinski. Apesar da regra de Lipinski tolerar uma violação, a preferência para compostos que apresentaram nenhuma violação foi empregada. O composto 15 também não foi selecionado devido a uma previsão negativa para cruzar a barreira hematoencefálica.

A técnica de empregar um sal para um medicamento é utilizada por empresas farmacêuticas para melhorar o perfil farmacocinético de absorção para corrente sanguínea (Paulekuhn; Dressman; Saal, 2007). O composto 9, por ser um sal (assim como cloroquina) e podendo ser ionizada, é facilmente dissolvido em meio aquoso, sendo um facilitador para a absorção do composto *in vivo* e um resultado *in silico* promissor.

As demais moléculas não citadas (1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 15) apresentaram os requisitos recomendados para um composto promissor.

Tabela 3 – Análise *in silico* de compostos derivados de anel quinolínico

| COMPOSTO | ORAL BIOD.* | BHE* | ABSORÇÃO DO TGI* | VIOLAÇÕES DE LIPINSKI | TIPO DE VIOLAÇÃO |
|----------|-------------|------|------------------|-----------------------|--|
| 1 | + | + | + | 0 | - |
| 2 | + | + | + | 0 | - |
| 3 | - | + | + | 1 | Massa molecular |
| 4 | + | - | + | 0 | - |
| 5 | + | + | + | 0 | - |
| 6 | + | + | + | 0 | - |
| 7 | + | + | + | 0 | - |
| 8 | + | + | + | 0 | - |
| 9 | + | + | + | 0 | - |
| 10 | + | + | + | 0 | - |
| 11 | + | + | + | 0 | - |
| 12 | + | + | + | 0 | - |
| 13 | + | - | + | 1 | Coefficiente de partição (logP) |
| 14 | + | - | - | 2 | Massa molecular e Coeficiente de partição (logP) |
| 15 | + | - | + | 0 | - |
| 16 | + | + | + | 1 | Coefficiente de partição (logP) |

Oral biod.*: biodisponibilidade oral; BHE*: barreira hematoencefálica; absorção dotgi*: absorção do trato gastrointestinal; + (probabilidade positiva do evento ocorrer); - (probabilidade negativa do evento ocorrer)

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

5.2 REALIZAÇÃO, *IN SILICO* DE DOCKING MOLECULAR DOS COMPOSTOS PARA IDENTIFICAR O POSSÍVEL ALVO DE INTERAÇÃO

Para um novo medicamento antimalárico ser lançado no mercado não basta ter bons resultados *in silico*. É necessário avaliar, além dos parâmetros farmacocinéticos e atividade antiplasmodial, se a molécula é capaz de interagir com facilidade com o plasmódio e essa interação deve ser reproduzida em modelos *in vivo*.

No Brazilian Malaria Molecular Targets (BraMMT) estão catalogados 35 alvos moleculares de *Plasmodium falciparum*, o que permite caracterizar e validar estudos *in silico* de novos compostos que tenham atividades contra diferentes alvos no parasito). Por meio desse banco é possível selecionar alvos moleculares apropriados para moléculas promissoras, além de prever mecanismos de ação para novas moléculas (Nunes *et al.*, 2019).

Para a seleção do alvo da molécula, é preciso considerar a localização do parasito. Por ser um parasito intracelular, o destino final da molécula deve atravessar a membrana plasmática e citoplasma da célula hospedeira até chegar aos receptores do vacúolo parasitóforo do plasmódio (Ribeiro, 2013). O transportador de hexose para *P. falciparum* (PfHT) foi considerado na literatura como potencial alvo farmacológico pelo fato de moléculas de glicose terem que atravessar as barreiras da célula hospedeira e do vacúolo parasitóforo para chegar até o parasito (Fonseca, 2016). Dado a importância dessa interação, os compostos 1, 2, 3, 4, 5, 8 e 9 (tabela 5) corroboram com a literatura e possuem afinidade por esse possível alvo farmacológico visando a morte do parasito por desbalanço de glicose. Moléculas derivadas de cloroquina e artemisinina atuam também no vacúolo parasitóforo, sugerindo ser um alvo fortemente associado à efetividade das drogas para o combate ao parasito (Croft, 2001; Fonseca, 2016; Leite, 2013).

A tabela 4 abaixo revela os valores de energia de ligação dos compostos 1 ao 9 frente aos alvos moleculares do *P. falciparum* os derivados aminoquinolínicos que demonstraram valores de energia mais baixos em relação ao ligante cristalográfico foram classificados como mais ativos. Os compostos 10 ao 16 não foram submetidos ao docking molecular por limitações da realização do estudo em tempo hábil para submeter o trabalho.

Tabela 4 - Valores de energia de ligação (kcal/mol) dos compostos aminoquinolínicos

| Alvo | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | Ligante cristalográfico | Alvo |
|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|----------------------------|---------|
| ILF3 | -6,8 | -7,6 | -4,9 | -8,3 | -8,2 | -6,3 | -0,9 | -6,6 | -7,7 | -9,6 | Vacuolo |

| | | | | | | | | | | | |
|------|------|------|------|-------|-------|------|------|------|------|-------|------------------------|
| | | | | | | | | | | | digestivo |
| 1LYX | -5,9 | -6,7 | -5,2 | -7,0 | -7,8 | -5,8 | -1,0 | -5,4 | -5,6 | -5,6 | Citoplasma |
| 1NHW | -7,7 | -8,8 | -6,3 | -9,5 | -9,5 | -7,0 | -0,9 | -7,8 | -7,9 | -8,3 | Apicoplasto |
| 105X | -4,7 | -5,5 | -4,4 | -6,0 | -6,0 | -5,2 | -0,8 | -5,0 | -5,6 | -1,0 | Citoplasma |
| 1QHG | -6,5 | -7,6 | -5,5 | -7,9 | -9,3 | -6,3 | -1,1 | -6,2 | -6,4 | -7,7 | Citoplasma |
| 1RL4 | -6,1 | -6,8 | -4,9 | -6,8 | -7,0 | -5,6 | -0,9 | -6,4 | -7,3 | -8,0 | Apicoplasto |
| 1TV5 | -8,3 | -9,6 | -6,9 | -9,5 | -9,0 | -8,8 | -1,0 | -9,3 | -9,4 | -9,2 | Núcleo e citoplasma |
| 1U4O | -6,6 | -7,2 | -5,0 | -8,1 | -8,0 | -6,2 | -0,8 | -6,6 | -7,2 | -8,1 | Citoplasma |
| 1YWG | -7,0 | -7,9 | -5,1 | -8,9 | -8,9 | -6,7 | -0,9 | -7,2 | -7,1 | -10,7 | Citoplasma |
| 2AAW | -5,8 | -7,0 | -5,1 | -8,0 | -7,7 | -5,5 | -0,9 | -6,1 | -5,9 | -9,1 | Citoplasma |
| 2ANL | -6,7 | -7,4 | -5,1 | -8,4 | -8,1 | -6,2 | -1,0 | -6,3 | -7,2 | -9,3 | Vacúolo digestivo |
| 2OK8 | -4,6 | -5,1 | -3,8 | -6,4 | -5,9 | -4,6 | -0,7 | -4,9 | -4,7 | -2,0 | Apicoplasto |
| 2PML | -7,7 | -9,0 | -5,9 | -9,3 | -9,0 | -7,4 | -1,0 | -8,1 | -8,5 | -6,9 | Citoplasma |
| 2Q8Z | -6,6 | -5,9 | -6,4 | -6,0 | -5,8 | -6,4 | -0,9 | -5,9 | -6,6 | -9,7 | Núcleo |
| 2VFA | -5,9 | -6,7 | -5,3 | -7,0 | -6,5 | -5,4 | -0,9 | -6,0 | -6,5 | -1,0 | Apicoplasto |
| 2VN1 | -8,0 | -8,9 | -5,8 | -9,3 | -9,1 | -6,7 | -1,2 | -7,9 | -7,8 | -14,6 | Núcleo |
| 2YOG | -8,1 | -8,4 | -6,2 | -9,8 | -9,9 | -7,8 | -1,1 | -8,4 | -8,1 | -8,4 | Núcleo |
| 3AZB | -0,3 | -0,5 | -0,3 | -0,2 | -0,3 | -0,3 | -0,1 | -0,2 | -0,2 | -1,0 | Citoplasma |
| 3BPF | -6,3 | -6,6 | -5,0 | -8,0 | -7,6 | -5,5 | -0,9 | -6,5 | -6,4 | -6,3 | Vacúolo digestivo |
| 3CLV | -6,6 | -9,6 | -6,2 | -7,7 | -9,6 | -6,8 | -1,0 | -7,4 | -7,0 | -11,7 | Citoplasma |
| 3FNU | -6,9 | -8,0 | -5,1 | -8,4 | -8,4 | -6,1 | -1,0 | -7,2 | -8,0 | -9,2 | Vacúolo digestivo |
| 3K7Y | -6,9 | -8,0 | -6,1 | -8,8 | -8,4 | -6,1 | -1,0 | -7,1 | -6,7 | -7,7 | Citoplasma |
| 3N3M | -7,4 | -6,2 | -6,8 | -5,8 | -6,6 | -6,6 | -0,9 | -6,7 | -7,2 | -9,6 | Apicoplasto |
| 3PHC | -8,6 | -7,0 | -7,0 | -8,4 | -8,8 | -7,7 | -1,1 | -7,3 | -8,8 | -8,3 | Núcleo |
| 3QS1 | -7,5 | -7,9 | -5,7 | -9,1 | -8,9 | -6,5 | -1,0 | -6,9 | -8,1 | -10,4 | Vacúolo digestivo |
| 3T64 | -6,5 | -7,2 | -5,5 | -8,2 | -8,3 | -6,1 | -0,9 | -7,1 | -6,8 | -8,1 | Núcleo |
| 4B1B | -8,2 | -8,9 | -6,7 | -10,8 | -10,3 | -7,4 | -1,0 | -7,4 | -9,1 | -12,3 | Citoplasma |
| 4C81 | -5,4 | -6,1 | -4,8 | -6,9 | -6,8 | -5,6 | -0,7 | -5,6 | -6,4 | -1,0 | mitocôndria |
| 4J56 | -8,9 | -9,4 | -6,5 | -10,4 | -10,6 | -8,1 | -1,0 | -7,9 | -8,3 | -13,0 | Citoplasma |
| 4N0Z | -5,1 | -5,7 | -4,5 | -6,4 | -6,5 | -4,8 | -0,8 | -5,3 | -5,6 | -1,0 | Apicoplasto |

| | | | | | | | | | | | |
|--------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------------|
| 4P7S | -5,8 | -6,0 | -4,7 | -6,7 | -7,2 | -5,4 | -0,9 | -6,1 | -5,5 | -6,0 | Citoplasma |
| 4QOX | -8,3 | -9,0 | -6,0 | -9,2 | -9,1 | -7,0 | -0,9 | -7,7 | -8,7 | -8,9 | Citoplasma |
| PfATP6 | -7,5 | -8,1 | -5,3 | -8,3 | -8,6 | -6,5 | -1,0 | -7,7 | -7,6 | -7,2 | Membrana |
| PfHT | -6,8 | -7,7 | -5,8 | -8,5 | -8,4 | -5,7 | -1,2 | -6,6 | -7,1 | -5,7 | Membrana |

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Durante a ancoragem molecular do composto/ligante por triagem virtual, observou-se que todos os compostos testados (com exceção do composto 7) obtiveram a energia de ligação similar ou superior à do ligante cristalográfico para os seguintes alvos: 1LYX isomerase (Parthasarathy *et al.*, 2002), 1O5X isomerase (Parthasarathy *et al.*, 2003), 2OK8 oxidorreductase (Milani *et al.*, 2007), 2PML transferase (Merckx *et al.*, 2007), 4C81 liase (O'rourke *et al.*, 2014), 4N0Z oxidorreductase (Yogavel *et al.*, 2014), PfATP6 ATPase de cálcio (Guimarães *et al.*, 2015), e PfHT transportador de hexose (Fonseca *et al.*, 2016; Fonseca *et al.*, 2017).

Os alvos ILYX, 1O5X, 2PML, 4C81 e 4N0Z estão localizados no citoplasma, enquanto que o alvo 2OK8 se liga na região do apicoplasto. A literatura discute que drogas que atuam no apicoplasto contribuem significativamente para a morte do parasito, e alvos que se direcionam a essa organela são promissores antimaláricos (Yeh; Derisi, 2011). Dessa forma, com a exceção do composto 7, os compostos testados são também promissoras novas drogas por atuarem nesse alvo.

5.3 AVALIAÇÃO IN VITRO DE CITOTOXICIDADE E ATIVIDADE ANTIPLASMODIAL

A Tabela 5 descreve os resultados do ensaio para citotoxicidade CC_{50} (concentração que reduz a viabilidade celular em 50%) e atividade antiplasmodial IC_{50} (concentração inibitória que reduz o crescimento do parasito em 50%), e o cálculo do índice de seletividade foi feito usando a razão $IS = (CC_{50}/IC_{50})$.

Para avaliar a atividade citotóxica dos compostos, realizou-se o ensaio de MTT em células das linhagens WI-26VA. Constatou-se que nenhum dos compostos demonstrou toxicidade até a concentração mais elevada testada (100 μ M), como evidenciado na Tabela 5.

Os compostos aminoquinolínicos sintéticos foram submetidos a testes de atividade antiplasmodica contra *P. falciparum* W2, resistente à cloroquina (ensaio SYBR GREEN I),

cujos resultados também são apresentados na Tabela 6. Verificou-se que os compostos exibiram valores de IC_{50} variando de 0,09 a 58,34 $\mu\text{M}/\text{ml}$.

Cerca de 5 milhões de compostos foram submetidos a ensaios direcionados aos estágios sanguíneos assexuados de *P. falciparum*, sendo que a atividade antiplasmodial mínima *in vitro* almejada tem se situado predominantemente na faixa de 1–2 μM . (Katsuno *et al.*, 2015). Assim, pelos dados da tabela 5 abaixo é possível sugerir os compostos 9 (0.44 μM) e 10 (0.09 μM) como os mais promissores para a terapêutica antimalárica.

De acordo com Katsuno e colaboradores (2015), é preciso também testar os compostos frente a uma linhagem de célula humana visando visualizar possível efeito tóxico da molécula testada. Todos os compostos não foram considerados tóxicos em células de fibroblasto pulmonar humanas (WI-26VA).

Seguindo o critério estabelecido por Katsuno e colaboradores (2015) e outros trabalhos do grupo de pesquisa (Bellei *et al.*, 2022), foram selecionados para teste *in vivo* moléculas com $IS > 10$ e sem nenhum desvio nas regras de Lipinski. O composto 7 foi selecionado para o teste em modelo animal por apresentar resultados satisfatórios tanto *in silico* quanto *in vitro*. A molécula 9 também apresenta alta atividade antiplasmodial por ter um índice de seletividade superior ao da cloroquina. A molécula 10 se destaca como a mais promissora para testes *in vivo*, com resultados semelhantes aos de antimaláricos de uso padrão como artesunato e cloroquina.

Tabela 5 - Resultados *in vitro* para a citotoxicidade (CC₅₀), atividade antiplasmodial (IC₅₀) e índice de seletividade dos compostos contra a cepa W2 de *Plasmodium falciparum*, na linha celular humana WI-26-VA-4 (CC₅₀) e índice de seletividade

| Compostos | CC₅₀ em células WI (μM/mL) | IC₅₀ em <i>P. falciparum</i> W2 (μM/mL) | IS |
|------------------|--|---|-----------|
| | WI ± DP* | <i>P. falciparum</i> W2 ± DP | |
| 1 | >100 | 6,25 | >16 |
| 2 | - | NA* | - |
| 3 | >100 | 1,38 | >72 |
| 4 | >100 | 44,95 | >2,22 |
| 5 | >100 | 7,79 | >12,84 |
| 6 | >100 | 6,81 | >14,18 |
| 7 | >100 | 5,96 | >16,77 |
| 8 | >100 | 58,34 | >1,71 |
| 9 | >100 | 0,44 | >226,15 |
| 10 | >100 | 0,09 | >1111,11 |
| 11 | >100 | 7,19 | >13,90 |
| 12 | >100 | 7,45 | >13,41 |
| 13 | >100 | 4,60 | >21,73 |
| 14 | >100 | 10,06 | >9,94 |
| 15 | >100 | 5,51 | >18,14 |
| 16 | >100 | 2,49 | >40,16 |
| CQ* | >100 | 0,66 | >152,32 |
| ART* | >100 | 0,03 | >3844,22 |

DP*: desvio padrão; NA*: sem atividade antiplasmodial; CQ: cloroquina e ART: artesunato (controle positivo).

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

5.4 AVALIAÇÃO IN VITRO DA INIBIÇÃO DA MULTIPLICAÇÃO DO PARASITO (IMP)

A tabela 6 descreve o resultado de IMP dos compostos 7, 9 e 10 nas dose de 15 e 30 mg/kg.

Tabela 6 - Resultados de IMP dos compostos 7, 9 e 10

| Composto | Dose (mg/kg) | Parasitemia \pm DP | | | n |
|----------|--------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|---|
| | | 5° dpi | 7° dpi | 10° dpi | |
| 7 | 15 | 0.60 \pm 0.15 (68.08) | 2.88 \pm 0.30 (31.06) | 6.4 \pm 0.35 (9.85) | 5 |
| 7 | 50 | 0.65 \pm 0.2 (65.42) | 2.84 \pm (32.60) | 6.3 \pm 0.55 (11.26) | 5 |
| 9 | 15 | 0.52 \pm 0.10 (72.31) | 1.54 \pm 0.25 (63.30) | 4.39 \pm 0.20 (38.16) | 5 |
| 9 | 50 | 0.58 \pm 0.10 (69,14) | 1.68 \pm 0.25 (60.02) | 6.17 \pm 0.50 (13,09) | 5 |
| 10 | 15 | 1.45 \pm 0.30 (22.87) | 3.52 \pm 0.35 (16.50) | 6.6 \pm 0.50 (7.04) | 5 |
| 10 | 50 | 1.40 \pm 0.30 (25.53) | 3.49 \pm 0.20 (17.20) | 6.8 \pm 0.8 (4.22) | 5 |
| CQ * | 10 | 0.30 \pm 0.1 (84.04) | 0.55 \pm 0.10 (86.80) | 1.2 \pm 0.25 (83.09) | 5 |
| Água | - | 1.88 \pm 0.01 | 4.22 \pm 0.44 | 7.1 \pm 0.5 | 5 |

dpi: dia pós infecção; DP: desvio padrão; CQ: cloroquina; n: número de animais testados

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

De acordo com o cálculo de inibição de multiplicação parasitária, o composto 7 apresentou um IMP satisfatório em ambas as doses do quinto (68,08% para 15 mg/kg e 65,42% para 50 mg/kg) ao sétimo dia (31,06% para 15 mg/kg e 32,60% para 50 mg/kg) após a infecção, sendo estatisticamente relevante a diferença entre o grupo tratado com o grupo que não recebeu tratamento (teste ‘t’, $p < 0,05$). A diminuição do porcentual de inibição do parasito começou a ser notado após 48 horas do fim do tratamento, resultados corroborados

por outros estudos (Santos *et al.*, 2024) que hipotetizam que o tempo de meia vida da droga tem papel crucial para a continuidade da inibição da multiplicação do parasito.

O composto 9 foi considerado efetivo até o dia 10, com inibição de 38,16% para a dose de 15 mg/kg. Na dose de 50 mg/kg, o composto foi efetivo (69,14% de inibição) até o quinto dia. Os dados demonstraram diferença significativa estatisticamente (teste t, $p < 0,05$) do grupo que não recebeu tratamento, comprovando atividade antimalárica até o 10º dia para a dose de 15 mg/kg e até o 5º dia para a dose de 50 mg/kg. A dose menor ser mais efetiva que a maior pode ser explicada pela existência de saturação dos receptores alvo do medicamento, como sugerido por trabalhos como de Santos e colaboradores (2004). O efeito chega em seu limiar independente da dose uma vez que o ponto de saturação foi ultrapassado e qualquer quantidade administrada além do necessário não é mais considerada a dose mínima efetiva, podendo até mesmo gerar impactos negativos devido a sua toxicidade (Fernandes, 1991).

O composto 10 não apresentou taxa de IMP eficaz *in vivo*, visto que em nenhum dos dias do seguimento do experimento apresentou taxa de IMP superior ou igual a 30%.

De acordo com o trabalho de Carvalho e colaboradores (1991), drogas são consideradas ativas quando reduzem a parasitemia em pelo menos 30%. Então, nesse estudo realizado, o composto 7 apresenta atividade *in vivo* antimalárica até o sétimo dia em ambas doses testadas e o composto 9 tem atividade até o décimo dia, ao passo que a cloroquina mantém altos índices de inibição da multiplicação do parasito no mesmo período. Estudos realizados por Santos e colaboradores (2024) demonstraram resultado semelhante e identificaram que o tempo de meia vida é o ponto chave para explicar o efeito. A cloroquina permanece na corrente sanguínea entre 20 a 60 dias, extendendo seu efeito antimalárico por mais tempo. Os compostos testados que apresentaram uma queda na taxa de eficiência ao longo do tempo, sugerem um tempo de meia vida inferior ao da cloroquina. O longo tempo de meia vida gera uma longa exposição da droga ao parasito, contribuindo para que o fenômeno de resistência seja construído (White, 2013; Woodrow; White, 2017). Haja visto que o tratamento foi finalizado no quinto dia pós infecção, estudos sobre o tempo de meia vida desses compostos podem ser realizados para confirmar a hipótese.

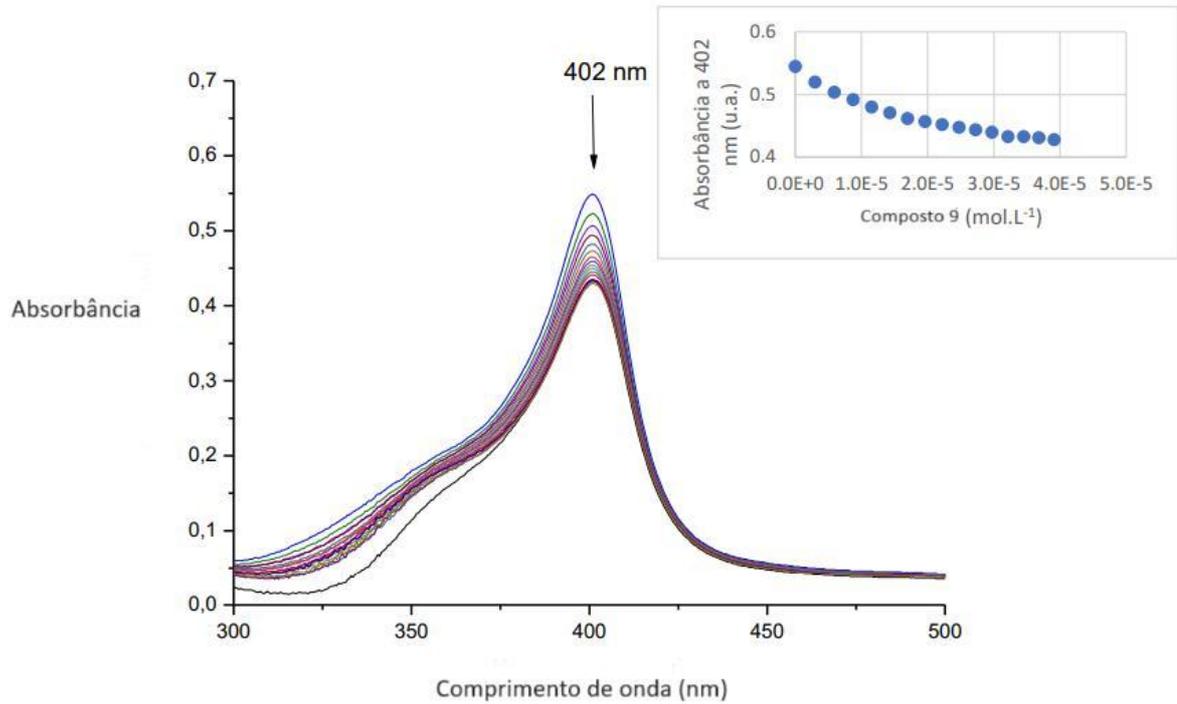
As taxas de crescimento parasitário observada em animais tratados com os compostos 7, 9 e 10 em ambas as doses (15 e 50 mg/kg) mostraram ser estatisticamente diferentes (teste t, $p < 0,05$) do grupo com cloroquina durante todos os dias de tratamento. Apesar disso, os compostos 7 e 9 são consideradas moléculas promissoras para o tratamento antimalárico por terem boa resposta nos testes *in silico*, *in vitro* e *in vivo*. Entre todas as

moléculas testadas, o composto 9 se destaca por apresentar um índice de seletividade superior ao da droga padrão (cloroquina) e apresentar a maior atividade antiplasmodial em modelo animal murino.

5.5 INTERAÇÃO DO COMPOSTO 9 COM FERRIPROTOPORFIRINA

Para determinação do mecanismo de ação dos compostos, a interação das moléculas com a ferriprotoporfirina (Fe(III)PPIX) foi avaliada. Durante o ciclo de vida intraeritrocítico do *Plasmodium*, a ferriprotoporfirina formada é altamente tóxica para o parasito. A cloroquina, da classe das 4-aminoquinolonas, age diretamente sobre o complexo ferriprotoporfirina, impedindo sua polimerização em hemozoína. A manutenção desse intermediário tóxico é responsável pela morte do parasito e as 4-aminoquinolonas, em geral, agem sob esse mesmo mecanismo de ação. O derivado aminoquinolínico sintético mais promissor (9) foi submetido a titulação espectrofotométrica UV-Vis a fim de monitorar a interação do composto com Fe(III)PPIX a partir da identificação de sua banda de Soret (402 nm). À medida que se adiciona o composto aminoquinolínico, menos ferriprotoporfirina está livre durante a leitura. A interação é confirmada através do resultado de titulação, que ao gerar um hipocromismo na banda de Soret, sugere a interação do derivado aminoquinolínico formando um complexo férrico (Marinho *et al.*, 2021).

Figura 9 - Titulação espectrofotométrica UV-Vis do composto 9



Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Foi observado um hipocromismo médio de 21,8% na banda de Soret do complexo ferriprotoporfirina após sucessivas adições do titulante (Composto 9), podendo ser devido ao fato do composto aminoquinolínico interagir com o complexo férrico. Determinou-se uma constante de associação $\text{Log } K = 4,66$ para o composto 9, após plotagem das curvas de absorbância *versus* concentração.

Esses resultados, corroboram com encontrados para cloroquina ($\text{Log } K = 4,97$) de acordo com o descrito na literatura por Marinho e colaboradores (2021). A existência da interação do composto 9 com o complexo de ferriprotoporfirina inibe sua polimerização e formação de hemozoína, e, dessa forma, leva a morte do parasito, de maneira similar ao que acontece com a cloroquina. A similaridade do mecanismo de ação da cloroquina com o composto 9 é apenas um indício que também pode ser confirmado pela interação com receptores do vacúolo parasitóforo PfHT do plasmódio, conforme descrito anteriormente em 5.1.2. Entretanto, ainda é necessário a completa elucidação por outros métodos futuramente, uma vez que os derivados aminoquinolínicos são constantemente utilizados para o tratamento de malária.

5.6 RESULTADOS DE DOSAGEM SOROLÓGICA DO COMPOSTO 9

As enzimas hepáticas TGO e TGP são importantes marcadores de lesão no fígado. O hepatócito, ao ocorrer dano celular, sofre lise e libera essas enzimas na corrente sanguínea, que podem ser mensuradas no soro por meio de ensaios colorimétricos. O soro de camundongos tratados com o composto 9, considerado o mais promissor, foi utilizado para avaliação da dosagem bioquímica dos marcadores hepáticos (figura 10).

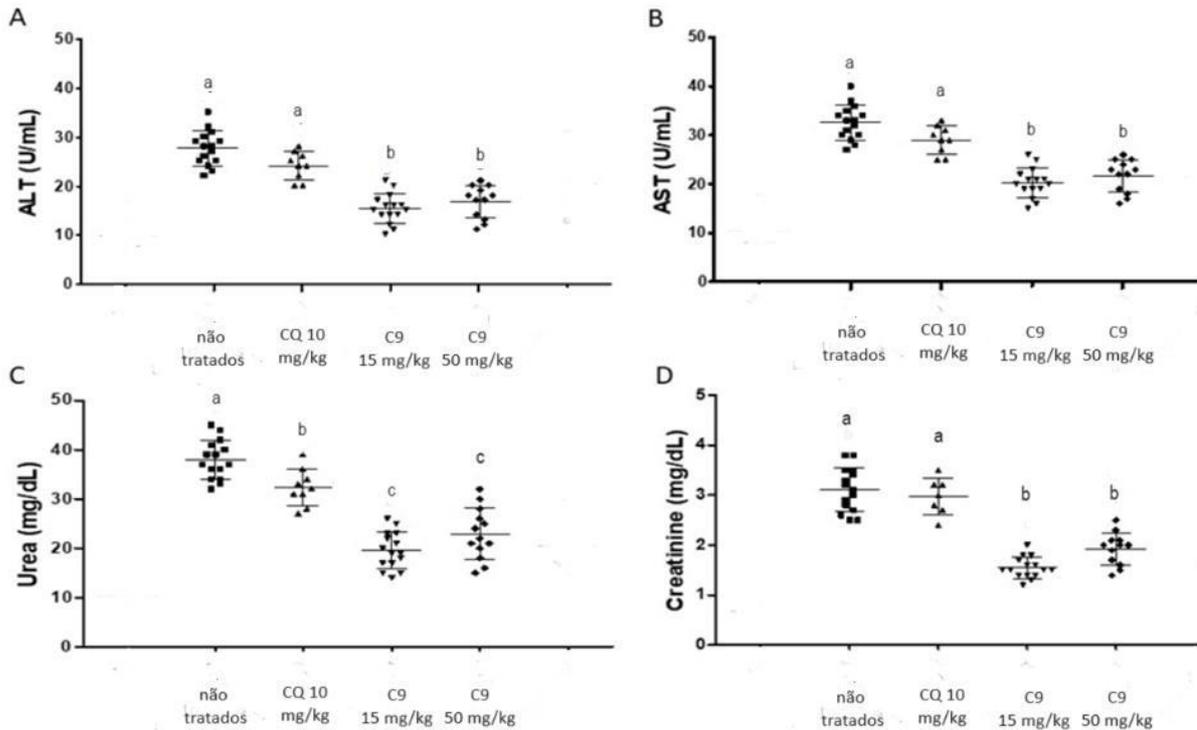
Estatisticamente, o grupo tratado apresentou níveis menores das enzimas TGO e TGP no soro quando comparados aos grupos tratados com cloroquina e sem tratamento. O resultado é um indício que o composto não prejudica a função hepática. Resultados semelhantes já foram observados em outros derivados aminoquinolínicos estudados por nosso grupo (Bellei *et al.*, 2022). Esses dados podem indicar que além de não causar nenhum dano à função hepática, o uso desse derivado aminoquinolínico pode contribuir como fator protetor para o fígado. É necessário, entretanto, um estudo mais aprofundado do tema para elucidar esse efeito.

O fígado é o maior responsável pelo metabolismo de substâncias no organismo. Nos hepatócitos existem agrupadas um conjunto de enzimas fundamentais para a metabolização, denominadas enzimas do citocromo P450 (CYP450). As CYP 450 são classificadas em famílias e divididas em isoformas, de acordo com suas características. As isoformas 1 e 3 são responsáveis pela maior parte do metabolismo de fase 1, onde ocorrem a oxidação, redução, hidroxilação e hidrólise, tornando o metabólito mais polar para facilitar sua excreção (Johansson *et al.*, 2011). Diversos fármacos podem atuar como inibidores ou indutores das enzimas do CYP 450, diminuindo ou aumentando, respectivamente, a resposta da metabolização. Os baixos valores encontrados das enzimas AST e ALT para o composto 9 podem indicar que o sal não é substrato das enzimas do citocromo P450, e dessa forma, a utilização de outros medicamentos concomitantemente com o composto 9 é segura por não interferir no metabolismo hepático, induzindo ou inibindo as enzimas do CYP 450 (Hakkola *et al.*, 2020).

Os rins são responsáveis pela excreção do medicamento, sendo importante que nenhum composto testado dificulte a depuração renal para que, conseqüentemente, não seja tóxico. Os parâmetros renais foram avaliados através da dosagem sorológica de ureia e creatinina. Similar aos parâmetros hepáticos, o grupo tratado com o composto 9 apresentou valores de ureia e creatinina estatisticamente menores que os grupos não tratados e tratados com cloroquina, sugerindo ser mais seguro para o uso como medicamento, de maneira similar ao efeito hepático visto nesse e em outros trabalhos (Bellei, 2022).

Dessa forma, é possível sugerir que o composto 9 não apresenta nenhum indicador sorológico de dano no fígado e nos rins, órgãos responsáveis pelo metabolismo e excreção dos fármacos (Marra *et al.*, 2021).

Figura 10 - Testes de função hepática [ALT (A), AST (B)] e renal [ureia (C), creatinina (D)]



CQ: cloroquina; C9: composto 9. Letras iguais (a, b, c) não indicam diferença significativa ($p > 0,05$) (teste não paramétrico – t student) Letras diferentes (a, b, c) indicam diferença significativa ($p > 0,05$) (teste não paramétrico – t student)

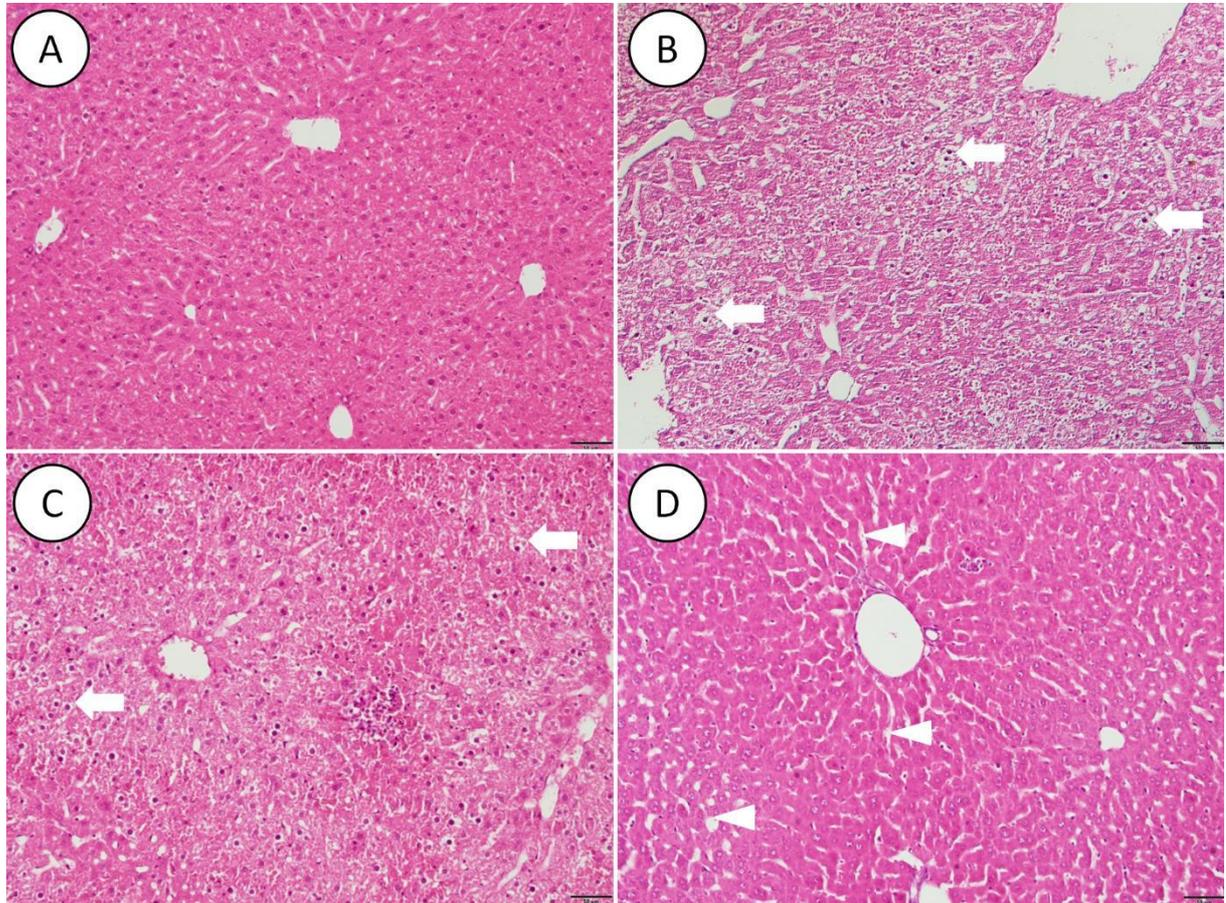
Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

5.7 RESULTADOS HISTOPATOLÓGICOS DO COMPOSTO 9

A análise histopatológica foi realizada em fragmentos de fígado, esôfago, intestino e rim. Não foram observadas alterações significativas e dignas de nota nas amostras provenientes do esôfago, intestino e rim, o que sugere que o composto 9 pode ser seguro. No fígado foram observadas alterações teciduais, em maior ou menor grau, na maioria dos animais tratados. No grupo tratado com cloroquina foi observado degeneração centrolobular, com acidofilia citoplasmática e atrofia de hepatócitos com aumento do espaço sinusoidal. Nos grupos tratados com composto 9 nas doses de 15/mg/kg e 50 mg/kg foram observadas degeneração vacuolar difusa, com núcleos picnóticos e aumento do espaço sinusoidal. Ainda, foram identificadas regiões apresentando acidofilia citoplasmática e áreas focais de infiltrado

inflamatório e necrose. A princípio, não foi observado correlação entre dose e alterações teciduais, não existindo um padrão de lesão definido.

Figura 11 - Análise histopatológica do fígado



A – Não tratados B – Tratado com cloroquina; C – Tratado com composto 9 15 mg/kg; D – Tratado com composto 9 50 mg/kg Seta: Degeneração vacuolar difusa, com núcleos picnóticos Cabeça de seta: Aumento do espaço sinusoidal. Barra de calibração: 50 µm

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

As regiões descritas como degeneração vacuolar difusa, com núcleos picnóticos são lesões reversíveis com áreas de acúmulo de água e eletrólitos no citoplasma e organelas, tornando-se volumosas (Wouters *et al.*, 2013). Apesar do achado, não é possível correlacionar com os compostos testados pois o padrão de lesão foi encontrado em diferentes grupos, inclusive nos tratados com cloroquina.

Lesões por degeneração vacuolar são descritas na literatura (Irulegui; Fadoni; Filho, 2019) como a lesão não letal mais comum diante de vários tipos de agressão. As principais causas são: distúrbio eletrolítico, físico, biológico e também químico por exposição a toxinas.

Para validar a origem da lesão, é necessário levar em consideração inúmeras variáveis além da estudada. Desse modo, o estudo considera que os compostos testados, assim como a cloroquina, não são prováveis causas da lesão por degeneração vacuolar.

6 CONCLUSÕES

Coletivamente, os resultados obtidos na nossa pesquisa indicam que as 16 novas moléculas derivadas do anel quinolínico possuem características fundamentais para o desenvolvimento de drogas antimaláricas. Em particular, os compostos 7, 9 e 10 demonstraram ser promissores como candidatos para a renovação terapêutica em malária devido aos seus baixos valores de IC_{50} , altos valores de CC_{50} e IS, bem como ao perfil farmacocinético favorável de absorção e à previsão *in silico* de boa biodisponibilidade por via oral.

Além disso, o composto 9 pode ser considerado o candidato mais promissor por se tratar de um sal, que facilita os eventos farmacocinéticos e farmacodinâmicos; baixos valores de IC_{50} ; demonstrar redução da inibição da multiplicação do parasito significativa até o décimo dia pós infecção; possuir mecanismo de ação parecido com a cloroquina confirmados através de resultados de titulação UV-Vis e também por ancoragem molecular, além de exibir segurança hepática e renal por análise histológica e sorológica. No entanto, são necessários esforços para otimizar a molécula, aumentando sua eficiência sobretudo em testes *in vivo*.

REFERÊNCIAS

- ACHAN, J. *et al.* Malaria medicines to address drug resistance and support malaria elimination efforts. **Expert Review of Clinical Pharmacology**, v. 11, n.1, p. 61-70, 2018.
- AGUIAR, A. C. *et al.* New approaches in antimalarial drug Discovery and development – a review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, b. 107, n. 7, p. 831-845, 2012.
- ALVARENGA, D. A. M. *et al.* An assay for the identification of Plasmodium simium infection for diagnosis of zoonotic malaria in the Brazilian Atlantic Forest. **Scientific Reports**, v. 8, n. 86, p. 1-10, 2018.
- ALVES, A.; MARTINS, A.; ADOLPHSSON, S.; BOCKORNY, B.; CARLETI, G.; CABRAL, G; SOUZA, A.C.P.; VIANNA, A. Malária grave importada: relato de caso. **Rev Bras Ter Intensiva**, v. 19, n. 2, p. 231-236, 2007.
- ANTINORI, S.; GALIMBERTI, L.; MILAZZO, L.; CORBELLINO, M. Plasmodium knowlesi: the emerging zoonotic malaria parasite. **Acta Trop**, v. 125, n. 2, p. 191-201, 2013.
- ASHLEY, E. A.; PHYO, A.; WOODROW, C. J. Malaria. **The Lancet**, v. 391, p. 1608, 2018.
- ASOJO, O. A. *et al.* Novel Uncomplexed and Complexed Structures of Plasmeprin II, an Aspartic Protease from Plasmodium falciparum. **Journal of Molecular Biology**, v. 327, n. 1, p. 173–181, mar. 2003.
- BELACHEW, E. B. Immune Response and Evasion Mechanisms of Plasmodium falciparum Parasites. **Journal of Immunology Research**, v. 2018, p. 1–6, 2018.
- BELL, C. A.; HALL, J. E.; KYLE, D. E.; GROGL, M.; OHEMENG, K. A.; ALLEN, M. A.; TIDWELL, R. R. Structure-Activity Relationships of Analogs of Pentamidine against Plasmodium Falciparum and Leishmania Mexicana Amazonensis. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 32, p.1381-1386, 1990.
- BELLEI, J. C. B. **Prospecção in silico, in vitro e in vivo de novos compostos antimaláricos com atividade sanguínea**. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Faculdade de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2022.
- BELLEI, J. C. B.; ALVES, F. M; BARBOSA, C. S.; DUARTE, C. L.; FONSECA, A. L.; PINTO, A. C. S.; RAIMUNDO, F. O.; CARPINTER, B. A.; LEMOS, A. S. O.; COIMBRA, E. S.; TARANTO, A. G.; ROCHA, V. N.; VAROTTI, F. P.; VIANA, G. H. R.; SCOPEL, K. K. G. Rational-Based Discovery of Novel β -Carboline Derivatives as Potential Antimalarials: From In Silico Identification of Novel Targets to Inhibition of Experimental Cerebral Malaria. **Pathogens**, v. 11, n. 12, p. 1529. 2022.
- BHAUMIK, P. *et al.* Crystal structures of the free and inhibited forms of plasmepsin I (PMI) from Plasmodium falciparum. **Journal of Structural Biology**, v. 175, n. 1, p. 73–84, jul. 2011.

- BRASIL, P. *et al.* Outbreak of human malaria caused by *Plasmodium simium* in the Atlantic Forest in Rio de Janeiro: a molecular epidemiological investigation. **The Lancet**, v. 5, p. 1038-1044, 2017.
- BRASIL (Ministério da Saúde). **Boletim Epidemiológico: Malária 2020**. 118p, 2020.
- BREWSTER, D. R.; KWIATKOWSKI, D.; WHITE, N. J. Neurological sequelae of cerebral malaria in children. **Lancet**, v. 336, n. 8722, p. 1039–1043, 1990.
- CARVALHO, L. H.; BRANDÃO, M. G.; SANTOS-FILHO, D.; LOPES, J. L.; KRETTLI, A. U. Antimalarial activity of crude extracts from Brazilian plants studied *in vivo* in *Plasmodium berghei*-infected mice and *in vitro* against *Plasmodium falciparum* in culture. **Braz J Med Biol Res.**, v. 24, n. 11, p. 1113-1123, 1991.
- CLARK, I. A.; SCHOFIELD, L. Pathogenesis of Malaria. **Parasitology Today**, v. 16, n. 10, p. 451–454, out. 2000.
- CLEMENTE, J. C. *et al.* Structure of the aspartic protease plasmepsin 4 from the malarial parasite *Plasmodium malariae* bound to an allophenylnorstatine-based inhibitor. **Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography**, v. 62, n. 3, p. 246–252, 1 mar. 2006.
- COATNEY, G. R.; COLLINS, W. E.; WARREN, M.; CONTACOS, P. G. The primate malarias. Washington (DC): **US National Institute of Allergy and Infectious Diseases**, 1971.
- COLLINS, W. E.; CONTACOS, P. G.; GUINN, E. G. Observations on the sporogonic cycle and transmission of *Plasmodium simium* da Fonseca. **The Journal of Parasitology**, v. 55, n. 4, p. 814–816, 1969.
- COSTA JÚNIOR, D. B.; ARAÚJO, J. S. C., OLIVEIRA, L. de M.; NERI, F. S. M.; MOREIRA, P. O. L.; TARANTO, A. G.; FONSECA, A. L.; VAROTTI, F. P.; LEITE, F. H. A. Identification of novel antiplasmodial compound by hierarquical virtual screening and *in vitro* assays. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 39, n. 9, p. 3378-3386, 2021.
- COWMAN, A. F.; KARCZ, S.; GALATIS, D.; CULVENOR, J. G. A P-glycoprotein homologue of *Plasmodium falciparum* is localized on the digestive vacuole. **J. Cell. Biol.** v. 113, n. 5, p. 1033-1042, 1991.
- CRAWLEY, J.; CHU, C.; MTOVE, G.; NOSTEN, F. Malaria in children. **Lancet**, v. 345, n. 9724, p. 1468-1481, 2010.
- CROFT, S. Antimalarial chemotherapy: mechanisms of action, resistance and new directions in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 6, n. 22, p. 1151, 2001.
- DAINA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific Reports**, n. 7, v. 42717, p. 1-13, 2017.

- DEANE, L. M.; DEANE, M. P.; FERREIRA, N. J. Studies on transmission of simian malaria and on the natural infection of man with *Plasmodium simium* in Brazil. **Bull World Health Organ**, v. 35, n. 5, p. 805-808, 1966.
- DE NIZ, M.; BURDA, P. C.; KAISER, G.; DEL PORTILLO, H. A.; SPIELMANN, T.; FRISCHKNECHT, F.; HEUSSLER, V. T. Progress in imaging methods: insights gained into *Plasmodium* biology. **Nature Review Microbiology**, v. 15, n. 1, p. 37-54, 2017.
- DONDORP, A. M. *et al.* Europe PMC Funders Group Artemisinin Resistance in *Plasmodium falciparum* Malaria. **N Engl J Med.**, v. 361, n. 5, p. 455–467, 2012.
- EASTMAN, R.T.; DHARIA, N.V.; WINZELER, E.A.; FIDOCK, D.A. Piperaquine resistance is associated with a copy number variation on chromosome 5 in drug-pressured *Plasmodium falciparum* parasites. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.55, n. 8, p. 3908–3916, 2011.
- ELOKELY, K. M.; DOERKSEN, R. J. Docking Challenge: Protein Sampling and Molecular Docking Performance. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 53, n. 8, p. 1934–1945, 26 ago. 2013.
- FERNANDES, F. Princípios de farmacocinética aplicada à anestesiologia. **Rev. Bras. Anest.**, v. 41, n. 5, p. 323-328, 1991.
- FERREIRA, M. E. S.; GOMES, M. S. M.; VIEIRA, J. L. F. Meteglobinemia em pacientes com malária por *Plasmodium vivax* em uso oral de primaquina. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v. 44, n. 1, p. 113-115, 2011.
- FERREIRA, M. U. Lacunas na área de pesquisa e desafios para o controle de malária no Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, n. 27, 2011.
- FRANÇA, T. C. C.; SANTOS, M. G. dos; FIGUEROA-VILLAR, J. D. Malária: aspectos históricos e quimioterapia. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1271–1278, 2008.
- GASTEIGER, J.; MARSILI, M. Iterative partial equalization of orbital electronegativity—a rapid access to atomic charges. **Tetrahedron**, v. 36, n. 22, p. 3219–3228, 1980.
- GOLDMAN, I. F.; QARI, S. H.; MILLET, P. G.; COLLINS, W. E.; LAL, A. A. Circumsporozoite protein gene of *Plasmodium simium*, a *Plasmodium vivax*-like monkey malária parasite. **Mol Biochem Parasitol.**, v. 57, p. 177–180, 1993.
- GONÇALVES, L.A.; CRAVO, P.; FERREIRA, M. U. Emerging *Plasmodium vivax* resistance to chloroquine in South America: na overview. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 5, p. 534-539, 2014.
- GREENWOOD, B. M. *et al.* Mortality and morbidity from malaria among children in a rural area of The Gambia, West Africa. **Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.81, n. 3, p.478-486, 1987.
- HAKKOLA, J.; HUKKANEN, J.; TURPEINEN, M.; PELKONEN, O. Inhibition and induction of CYP enzymes in humans: an update. **Archives of Toxicology**, v. 94, p. 3671–

3722, 2020.

HUANG, B. *et al.* Prevalence of crt and mdr-1 mutation in Plasmodium falciparum isolates from Grande Comore island after withdrawal of chloroquine. **Malaria Journal**, v. 15, n. 414, p. 1-9, 2016.

IDRO, R.; JENKINS, N. E.; NEWTON, C. R. Pathogenesis, clinical features, and neurological outcome of cerebral malaria. **The Lancet Neurology**, v. 4, n. 12, p. 827–840, dez. 2005.

IMWONG, M. *et al.* Asymptomatic natural human infections with the simian malaria parasites Plasmodium cynomolgi and Plasmodium Knowlesi. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 219, n. 5, p. 695-702, 2019.

IRULEGUI, R. S. C.; FADONI, I. O.; FILHO, I. O. **Manual de Patologia**. Faculdade de Medicina de Itajubá. 2019.

IYER, J.; GRÜNER, A. C.; RÉNIA, L.; SNOUNOU, G.; PREISER, P. R. Invasion of host cells by malaria parasites: a tale of two protein families. **Molecular Microbiology**, v. 65, n. 2, p. 231-349, 2007.

JIANG, X. *et al.* Synergistic effect of combined artesunate and tetramethylpyrazine in experimental cerebral malaria. **ACS Infect. Dis.**, v. 6, n. 9, p. 2400-2409, 2020.

JOHANSSON, I.; INGELMAN-SUNDBERG, M. Genetic polymorphism and toxicology-with emphasis on cytochrome P450. **Toxicological Sciences**, v. 120, n. 1, p. 1-13, 2011.

JOHN, C. C. *et al.* Adjunctive therapy for cerebral malaria and other severe forms of Plasmodium falciparum malaria. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 8, n. 9, p. 997–1008, set. 2010.

KATSUNO, K. *et al.* Hit and lead criteria in drug discovery for infectious diseases of the developing world. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, n. 11, p. 751-758, 2015.

KERR, I. D. *et al.* Structures of Falcipain-2 and Falcipain-3 Bound to Small Molecule Inhibitors: Implications for Substrate Specificity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 52, n. 3, p. 852–857, 12 fev. 2009.

KUMAR, S.; BANDYOPADHYAY, U. Free heme toxicity and its detoxification systems in human. **Toxicology Letters**, v. 157, n. 3, p. 175, 2005.

LA-SCALEA, M. A.; FERREIRA, E. I.; SILVA, H. S. R. C. Redução voltamétrica de artemisinina e sua interação com grupo heme (hemina). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 7, p. 371-383, 2007.

LEITE, *et al.* Malaria: from drugs to new molecular targets. **Biochemistry and biotechnology reports**, v. 2, 2013.

LINDNER, S. E.; MILLER, J. L.; KAPPE, S. H. I. Malaria parasite pre-erythrocytic infection: preparation meets opportunity. **Cellular Microbiology**, v. 14, n. 3, p. 316–324, 2012.

LIPINSKI, C. A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B. W.; FEENEY, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 23, n. 1-3, p. 3-25, 1997.

MAIA, E. H. B. *et al.* Octopus: a platform for the virtual high-throughput screening of a pool of compounds against a set of molecular targets. **Journal of Molecular Modeling**, v. 23, n. 26, 7 jan. 2017.

MARINHO, J. A.; GUIMARÃES, D. S. M.; GLANZMANN, N.; PIMENTEL, G. A.; NUNES, I. K. C.; PEREIRA, H. M. G.; NAVARRO, M.; VAROTTI, F. P.; SILVA, A. D.; ABRAMO, C. In vitro and in vivo antiplasmodial activity of novel quinoline derivative compounds by molecular hybridization. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 215, n. 113271, p. 1-9, 2021.

MARQUES, A. *et al.* MolAr - Molecular Architect. Patent: Computer Program. Register number: BR512018052442-7. Date Added: 01/02/2019. Title: "MolAr - Molecular Architect". Registration institution: **INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial.**, 2019.

MARQUES, M. M. *et al.* *Plasmodium vivax* Chloroquine resistance and Anemia in the Western Brazilian Amazon. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n.1, p. 342, 2014.

MARRA, F. *et al.* Recommendations for Dosing of Repurposed COVID-19 Medications in Patients with Renal and Hepatic Impairment. **Drugs in R and D**, v. 21, n.1, p. 342, 2021.

MORRIS, G. M. *et al.* AutoDock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility. **Journal of Computational Chemistry**, v. 30, n. 16, p. 2785–2791, dez. 2009.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, dez. 1983.

MUELLER, I. *et al.* Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite. **Lancet Infect Dis.**, v. 9, n. 9, p. 555-566, 2009.

National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. **Guide for the Care and Use of Laboratory Animals**. 8th ed. Washington, DC, USA: National Academies Press (US), 2011.

NOEDL, H.; SE, Y.; SCHAECHER, K.; SMITH, B.L.; SOCHEAT, D.; FUKUDA, M.M. Evidence of artemisinin-resistant malaria in western Cambodia. **The New England Journal of Medicine**, v. 359, n. 24, p. 2619–2620, 2008.

NUNES, R. R. *et al.*. Brazilian Malaria Molecular Targets (BraMMT): Selected Receptors for virtual High-Throughput Screening Experiments. **Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz.**, v. 114. p. 1-10, 2019.

OUI, M.; AUGEREAU, J. M.; PALOQUE, L; BENOIT-VICAL, F. Plasmodium falciparum resistance to artemisinin-based combination therapies: A sword of Damocles in the path toward malaria elimination. **Parasite.** v. 25, n. 24, 2018.

PACKARD, R. M. The origins of Antimalarial-Drug Resistance. **The New England journal of Medicine.** v. 371, n. 5, p. 397, 2014.

PATCHEN, L. C.; CAMPBELL, C. C.; WILLIAMS, S. B. Neurologic reactions after a therapeutic dose of mefloquine. **New England Journal of Medicine**, v. 221, p.1415-1416, 1989.

PAULEKUHN, G. S.; DRESSMAN, J. B.; SAAL, C. Trends in Active Pharmaceutical Ingredient Salt Selection based on Analysis of the Orange Book Database. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 50, n. 26, p. 6665–6672, 1 dez. 2007.

PERRY, J. A.; OLVER, C. S.; BURNETT, R. C.; AVERY, A. C. Cutting edge: the acquisition of TLR tolerance during malaria infection impacts T cell activation. **The Journal of Immunology**, v.175, p. 5921-5925, 2005.

PETERS W. Drug Resistance in Plasmodium Berghei. I. Chloroquine Resistance. **Exp. Parasitol**, v. 17, p 80-89, 1965.

PHILLIPS, M. A. *et al.* Malaria. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, n. 17050, p. 1-24, 21 dez. 2017.

PHIMPRAPHI, W. *et al.* Longitudinal study of Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax in a Karen population in Thailand. **Malaria Journal**, v. 7., n. 99, p.1-11, 2008.

PINHEIRO, A. C.; BISPO, M. L. F.; SOUZA, M. V. N. A importância do núcleo quinolínico e seus derivados no desenvolvimento de fármacos. **Revista Fitos**, v. 5, n. 3, p. 53, 63, 2010.

PLOWE, C. V. Malaria chemoprevention and drug resistance: a review of the literature and policy implications. **Malaria Journal**, v. 21, n. 1, p. 104, 24 dez. 2022.

PRADINES, B.; DORMOI, J.; BRIOLANT, S.; BOGREAUX, H.; ROGIER, C. La résistance aux antipaludiques. **Revue francophone des laboratoires**, v. 422, p. 51-62, 2010.

PRICE, R. N. *et al.*, Mefloquine resistance in *Plasmodium falciparum* and increased pfmdr1 gene copy number. **The Lancet**, v. 364, n. 9432, p.438-447, 2004.

RATHOD, G. K. *et al.* New structural classes of antimalarials. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 242, p. 114653, 2022.

RIDLEY, R. G. Medical need, scientific opportunity and drive for antimalarial drugs. **Nature**, v. 415, n. 6872, p. 686-693, 2002.

SANTOS, F. M.; SILVEIRA, G. P. E.; NOÉL, F. Estudos de bioequivalência para fármacos que apresentam farmacocinética não-linear. **Infarma**, v. 16, n. 1-2, p. 41-43, 2004.

SANTOS, M. B. V.; GONTIJO, D. C.; NASCIMENTO, M. F. A.; PAULA, R. C.; BELLEI, J. C. B.; RAIMUNDO, F. O.; SCOPEL, K. K. G.; OLIVEIRA, A. B.; MOURÃO, R. H. V. In vitro and in vivo antimalarial activity, cytotoxicity and phytochemical HRMS² profile of plants from western Pará state, Brazilian Amazon. **Chem. Biodiversity**, v. 21, n. 1, 2024.

SCHLITZER, M. Malaria Chemotherapeutics Part I: History of Antimalarial Drug Development, Currently Used Therapeutics, and Drugs in Clinical Development. **ChemMedChem**, v. 2, n. 7, p. 944–986, 9 jul. 2007.

SHERMAN, I. W. Amino acid metabolism and protein synthesis in malarial parasites. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 55, n. 2, p. 265, 1977.

SILVA, C. M.; SANTOS, E. B.; COSTA, E. G.; FILHO, M. S. G.; GUERREIRO, J. F.; PÓVOA, M. M. Alterações clínicolaboratoriais em pacientes com malária por *Plasmodium vivax* e deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase tratados com 0,50 mg/kg/dia de primaquina. **Rev. Soc. Bra. Med. Trop.**, v. 4, 2004.

SILVA, L. H. P.; OLIVEIRA, V. E. G. O desafio da malária: o caso brasileiro e o que se pode esperar dos progressos da era genômica. **Ciência Saúde Coletiva**, v. 7, 2002.

SILVA, T. H. Á. *et al.* Estudo de modelagem molecular de complexos ferriprotoporfirina-IX e quinolinocarbinolaminas antimaláricas: proposta de um farmacóforo. **Química Nova**, v. 28, n. 2, p. 244, 2005.

SINGH, B. *et al.* A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. **Lancet**, v. 363, n. 9414, p. 1017-1024, 2004.

SODRÉ, F. L.; COSTA, J. C. B.; LIMA, J. C. C. Evaluation of renal function and damage: a laboratorial challenge. **J. Bras. Patol. Med. Lab**, v. 43, n. 5, p. 329-337, 2007.

SOUZA, N. B. Antimaláricos a partir de moléculas obtidas por síntese como análogos de cloroquina e compostos naftoquinoidais. 2015. 113 f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – **Fundação Oswaldo Cruz**, Centro de Pesquisas René Tachou, Belo Horizonte. 2015.

STEWART, J. J. P. Optimization of parameters for semiempirical methods VI: more modifications to the NDDO approximations and re-optimization of parameters. **Journal of Molecular Modeling**, v. 19, n. 1, p. 1–32, 28 jan. 2013.

SULTAN, A. A.; THATHY, V.; FREVERT, U.; ROBSON, K. J.; CRISANTI, A.; NUSSENZWEIG, V.; NUSSENZWEIG, R. S.; MÉNARD, R. TRAP is necessary for gliding motility and infectivity of plasmodium sporozoites. **Cell**, v. 90, n. 3, p. 511-522, 1997.

TA, T.H.; HISAM, S.; LANZA, M.; JIRAM, A.L.; ISMAIL, N.; RUBIO, J.M. First case of naturally acquired human infection with *Plasmodium cynomolgi*. **Malaria Journal**, v. 13, n. 68, p. 1-7, 2014.

THAM, W. H.; BEESON, J. G.; RAYNER, J. C. Plasmodium vivax vaccine research – we've only Just begun. **Int. J. Parasitol.**, v. 47, n. 2-3, p. 111-118, 2017.

TIAN, S. *et al.* The application of in silico drug-likeness predictions in pharmaceutical research. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 86, p. 2–10, jun. 2015.

TORRE, S.; LANGLAIS, D.; GROS, P. Genetic analysis of cerebral malaria in the mouse model infected with Plasmodium berghei. **Mammalian Genome**, v. 29, n. 7-8, p. 488-506, 2018.

TRAGER, W.; JENSEN, J. B. Human malaria parasites in continuous culture. **Science (New York, N.Y.)** v. 193, p. 673–675, 1976.

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of Computational Chemistry**, v. 31, n. 2, p. 455-461, 2010.

URSU, O. *et al.* Understanding drug-likeness. **WIREsComputational Molecular Science**, v. 1, n. 5, p. 760–781, 28 set. 2011.

VALSALAM, S. *et al.* Biosynthesis of Silver and Gold Nanoparticles Using Musa Acuminata Colla Flower and Its Pharmaceutical Activity against Bacteria and Anticancer Efficacy. **J. Photochem. Photobiol. B Biol.**, v. 201, 2019.

VASCONCELOS, K. F. *et al.* Mutation in *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase of isolates from the Amazon Region of Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 5, p. 721-728, 2000.

VOSSSEN, M. G.; PFERSCHY, S.; CHIBA, P.; NOEDL, H. The SYBR green I malaria drug sensitivity assay: performance in low parasitemia samples. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 82, n. 3, p. 398-01, 2010.

WASSMER, S. C.; GRAU, G. E. R. Severe malaria: what's new on the pathogenesis front? **International Journal for Parasitology**, v. 47, n. 2–3, p. 145–152, 2017.

WEINBERG, E.D.; MOON, J. Malaria and iron: history and review. **Drug Metabolism Reviews**, v.41, n.4, p. 644-662, 2009.

WHITE, N. J. Antimalarial drug resistance. **Journal of Clinical Investigation**. v. 113, n.8, p.1084, 2004.

WHITE, N. J. Qinghaosu (Artemisinin): The price of Success. **Science**, v. 320, n.5874, p.330, 2008.

WHITE, N. J. Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Considerations in Antimalarial Dose Optimization. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 12, p. 5792– 5807, 2013.

WOODROW, C. J.; WHITE, N. J. The clinical impact of artemisinin resistance in Southeast Asia and the potential for future spread. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 41, n. 1, p. 34-48, 2017.

World Health Organization. Global Technical Strategy for Malaria 2016-2030, **World Health Organization**, 2015.

World Health Organization. WHO Global Technical Strategy for Malária 2016- 2030, 2015a. **WHO**, 35p., 2015.

World Health Organization. WHO Guidelines for Malaria 31 March 2022. **World Health Organization**; Geneva, Switzerland: 2022. p.20

World Malaria Report 2022. **World Health Organization**, 2022.

WOUTERS, A.T.B.; BOABAID, F.M.; FREDO, G.; WOUTERS, F.; DRIEMEIER, D. Caracterização imuno-histoquímica das alterações encefálicas em bovinos com hepatopatia tóxica por *Senecio* sp. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 33, p. 1325-1331, 2013.

YEH, E.; DERISI, L. L. Chemical rescue of malaria parasites lacking an apicoplast defines organelle function in blood-stage *Plasmodium falciparum*. **PLOS Biology.**, v. 9, n. 8, 2011.

YOUNG, M.D; MOORE, D.V., Chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, n. 10, p. 317-320, 1961.

ZOFOU, D. A diversity of approaches to address the challenge of drug-resistance in malaria. **Journal of Biotechnology and Biomaterials**, v.1, n.7, p.1-3, 2011.

ANEXO A - Certificado CEUA



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
CERTIFICADO**

Certificamos que a proposta intitulada "**Avaliação in vivo da atividade antimalárica de compostos sintéticos derivados de quinolinas com efeito esquizotóxica promissora em estudos in vitro.**" protocolo número 028/2022, sob responsabilidade de Kézia Katiani Gorza Scopel e equipe Felipe Oliveira Raimundo, Jessica Corrêa Bezerra Bellei e Adilson David da Silva – que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebra* (exceto homem), para fins de pesquisa científica - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de Julho de 2009, bem como normas editadas pelo Conselho de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Juiz de Fora na reunião de 02/05/2023.

We certify that the proposal "**Avaliação in vivo da atividade antimalárica de compostos sintéticos derivados de quinolinas com efeito esquizotóxica promissora em estudos in vitro.**", protocol number 028/2022, under the responsibility of Kézia Katiani Gorza Scopel and team Felipe Oliveira Raimundo, Jessica Corrêa Bezerra Bellei and Adilson David da Silva – which involves the use of animals belonging to the phylum *Chordata*, subphylum *Vertebra* (except human beings), for scientific research purposes – is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, and Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethic Committee of Animal Use of the Federal University of Juiz de Fora/MG in the meeting of 05/02/2023.

| | |
|---|---|
| Finalidade | () Ensino (x) Pesquisa Científica |
| Vigência da autorização | 19/06/2023 a 30/05/2026 |
| Médico Veterinário responsável pela pesquisa ART e vigência | Adolfo Firmino da Silva Neto ART: 11322/21 Validador: 2cd9508dc6666ee91e103d3c03d3c0e488b9c |
| Espécie/linhagem/raça | Camundongo C57BL/6 |
| Nº de animais | 268 |
| Peso/Idade | 6 a 8 semanas |
| Sexo | Fêmeas |
| Procedência dos animais | CBR/UFJF |
| Local de manutenção | Sala de manutenção de animais de experimentação do Núcleo de |

dos animais

Pesquisas em Parasitologia (NUPEP) do ICB-UFJF.

APROVEITAMOS A OPORTUNIDADE PARA INFORMAR QUE:

- 1) O projeto/treinamento de pesquisa deve ser desenvolvido conforme delineado no processo aprovado;
- 2) A CEUA/UFJF deve ser informada de todos os fatos relevantes que alterem o curso normal do projeto/treinamento. É papel do pesquisador responsável assegurar medidas imediatas adequadas frente a e evento não previstos.
- 3) Eventuais modificações ou emendas ao processo devem ser apresentadas à CEUA/UFJF de forma clara e sucinta, identificando a parte a ser modificada e suas justificativas.

- No caso de treinamento, esta aprovação tem validade de 12 meses a partir da data de aprovação pela CEUA/UFJF e para cada evento realizado nesse período, o pesquisador responsável deverá apresentar um relatório das atividades realizadas;
- No caso de projeto de pesquisa, esta aprovação tem validade de acordo com o cronograma proposto no protocolo. Os relatórios deverão ser enviados a cada 12 (doze meses), a partir da data de aprovação da CEUA/UFJF.

- 4) Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

Atenciosamente,

CEUA/UFJF



Documento assinado eletronicamente por **Ana Eliza Andreazzi, Coordenador(a) em exercício**, em 15/06/2023, às 15:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-UFJF (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **1252756** e o código CRC **321A640D**.

ANEXO B - Artigos publicados em colaboração durante o mestrado

> [Pathogens](#). 2022 Dec 13;11(12):1529. doi: 10.3390/pathogens11121529.

Rational-Based Discovery of Novel β -Carboline Derivatives as Potential Antimalarials: From In Silico Identification of Novel Targets to Inhibition of Experimental Cerebral Malaria

Fernanda de Moura Alves ¹, Jessica Correa Bezerra Bellei ², Camila de Souza Barbosa ¹, Caíque Lopes Duarte ¹, Amanda Luisa da Fonseca ¹, Ana Claudia de Souza Pinto ¹, Felipe Oliveira Raimundo ², Bárbara Albuquerque Carpinter ², Ari Sérgio de Oliveira Lemos ², Elaine Soares Coimbra ², Alex Gutterres Taranto ¹, Vinícius Novaes Rocha ³, Fernando de Pilla Varotti ¹, Gustavo Henrique Ribeiro Viana ¹, Kézia K G Scopel ²

Affiliations + expand

PMID: 36558863 PMCID: PMC9781199 DOI: 10.3390/pathogens11121529

Abstract

Malaria is an infectious disease widespread in underdeveloped tropical regions. The most severe form of infection is caused by *Plasmodium falciparum*, which can lead to development of cerebral malaria (CM) and is responsible for deaths and significant neurocognitive sequelae throughout life. In this context and considering the emergence and spread of drug-resistant *P. falciparum* isolates, the search for new antimalarial candidates becomes urgent. β -carbolines alkaloids are good candidates since a wide range of biological activity for these compounds has been reported. Herein, we designed 20 chemical entities and performed an in silico virtual screening against a pool of *P. falciparum* molecular targets, the Brazilian Malaria Molecular Targets (BRAMMT). Seven structures showed potential to interact with PfFNR, PfPK7, PfGrx1, and PfATP6, being synthesized and evaluated for in vitro antiplasmodial activity. Among them, compounds 3–6 and 10 inhibited the growth of the W2 strain at μ M concentrations, with low cytotoxicity against the human cell line. In silico physicochemical and pharmacokinetic properties were found to be favorable for oral administration. The compound 10 provided the best results against CM, with important values of parasite growth inhibition on the 5th day post-infection for both curative (67.9%) and suppressive (82%) assays. Furthermore, this compound was able to elongate mice survival and protect them against the development of the experimental model of CM (> 65%). Compound 10 also induced reduction of the NO level, possibly by interaction with iNOS. Therefore, this alkaloid showed promising activity for the treatment of malaria and was able to prevent the development of experimental cerebral malaria (ECM), probably by reducing NO synthesis.

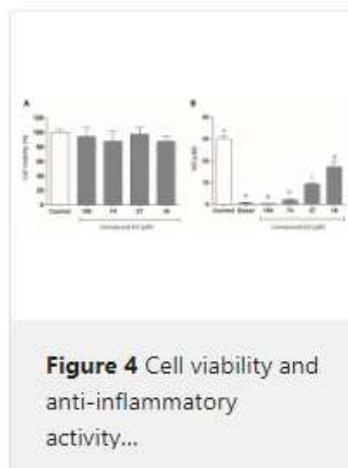
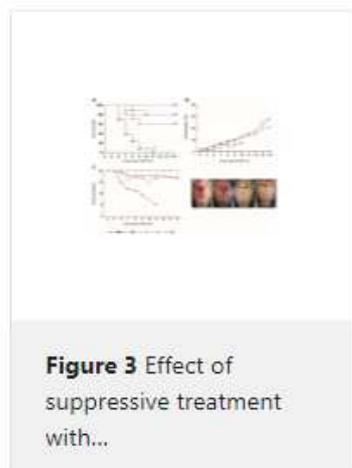
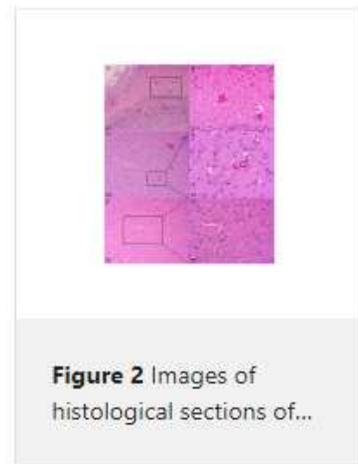
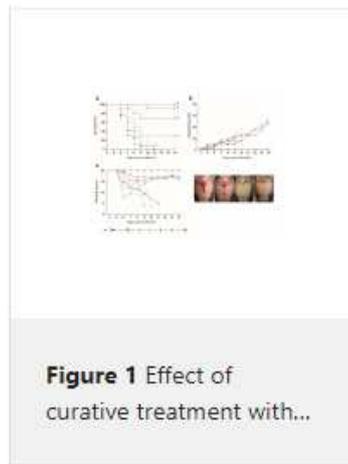
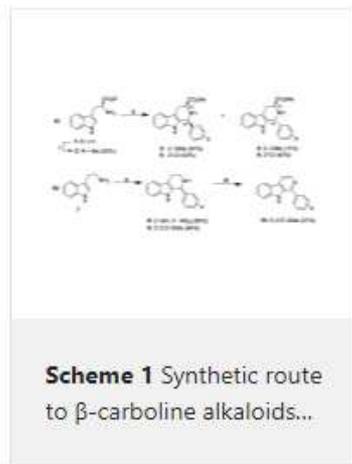
Keywords: antimalarial chemotherapy; cerebral malaria; experimental cerebral malaria; malaria; nitric oxide; β -carbolines alkaloids.

PubMed Disclaimer

Conflict of interest statement

The authors declare no conflict of interest.

Figures





Research Article

***In Vitro* and *in Vivo* Antimalarial Activity, Cytotoxicity and Phytochemical HRMS² Profile of Plants from the Western Pará State, Brazilian Amazonia**

Maria Beatriz Viana dos Santos, Douglas Costa Gontijo, Maria Fernanda Alves do Nascimento, Renata Cristina de Paula, Jessica Correia Bezerra Bellei, Felipe Oliveira Raimundo ... [See all authors](#) ▾

First published: 27 November 2023 | <https://doi.org/10.1002/cbdv.202301082>

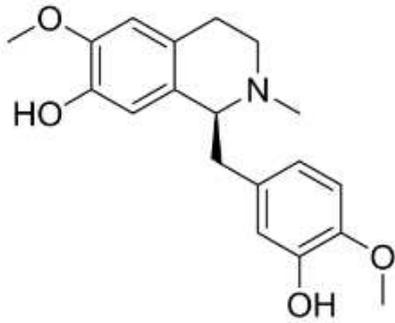
[Read the full text](#) >

 PDF  TOOLS  SHARE

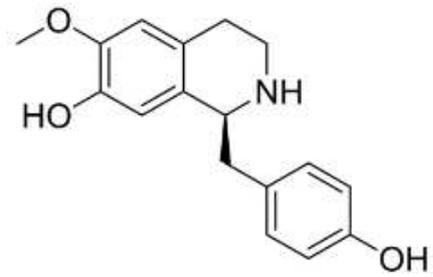
Abstract

Ethnopharmacology and botanical taxonomy are valid criteria used to selecting plants for antimalarial bioprospection purposes. Based on these two criteria, ethanol extracts of 11 plants from Santarém City vicinities, Western Pará State, Brazilian Amazonia, had their *in vitro* antiplasmodial activity against chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* (W2 clone) assessed by the PfLDH method, whereas their cytotoxicity to HepG2-A16 cells was assessed through MTT assay. *Acmella oleracea*, *Siparuna krukovii* and *Trema micrantha* extracts disclosed the highest rate of parasite growth inhibition (90 %) in screening tests. *In vivo* antimalarial assays were conducted with these extracts against *Plasmodium berghei* (NK 65 strain) infected mice. Inhibition rate of parasite multiplication ranged from 41.4 % to 60.9 % at the lowest extract dose (25 mg/kg). HPLC-ESI-HRMS² analyses allowed the putative identification of alkylamides, fatty acids, flavonoid glycosides and alkaloids in ethanol extracts deriving from these three plant species. Results pointed towards *A. oleracea* flowers ethanol extract as the most promising potential candidate to preclinical studies aiming the development of antimalarial phytomedicine.

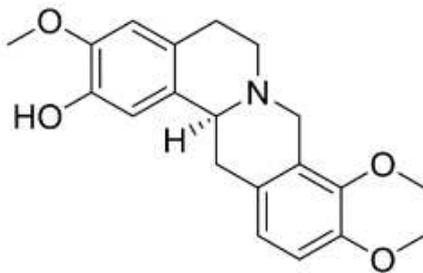
Graphical Abstract



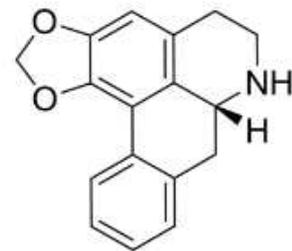
3.1 Reticuline
(m/z 330.1696 [M + H]⁺)



3.3 Coclaurine
(m/z 286.1437 [M + H]⁺)



3.2 Isocorypalmine
(m/z 342.1702 [M + H]⁺)



3.4 Anonaine
(m/z 266.1180 [M + H]⁺)

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.