

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

Juliane Aparecida Marinho

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO* DA ATIVIDADE ANTIPLASMODIAL
E CITOTOXICIDADE DE NOVOS COMPOSTOS DERIVADOS DE 4-
AMINOQUINOLINAS**

Juiz de Fora
2019

JULIANE APARECIDA MARINHO

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO* DA ATIVIDADE ANTIPLASMODIAL
E CITOTOXICIDADE DE NOVOS COMPOSTOS DERIVADOS DE 4-
AMINOQUINOLINAS**

Tese de Doutorado submetida à banca examinadora do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas- Ênfase em Imunologia e Doenças Infecto-parasitárias, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas.

**Orientadora: Profa. Dra. Clarice Abramo
Coorientador: Prof. Dr. Adilson David da Silva**

JUIZ DE FORA
2019

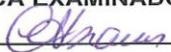
JULIANE APARECIDA MARINHO

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO* DA ATIVIDADE ANTIPLASMODIAL E CITOTOXIDADE DE
NOVOS COMPOSTOS DERIVADOS DE 4-AMINOQUINOLINAS**

Tese de Doutorado submetida à banca examinadora do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Ênfase em Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos necessários para obtenção do Grau de Doutor em Ciências Biológicas.

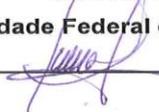
Aprovada em: 27 / 2 / 2019.

BANCA EXAMINADORA:

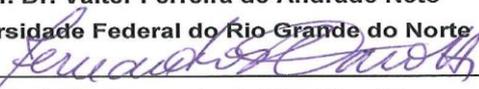


Prof.ª Dr.ª Clarice Abramo

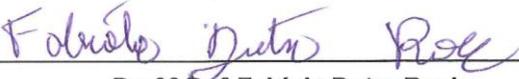
**Orientadora
Universidade Federal de Juiz de Fora**



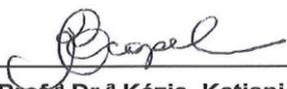
Prof. Dr. Válder Ferreira de Andrade Neto
Universidade Federal do Rio Grande do Norte



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



Prof.ª Dr.ª Fabíola Dutra Rocha
Universidade Federal de Juiz de Fora



Prof.ª Dr.ª Kézia Katiani Gorza Scopel
Universidade Federal de Juiz de Fora

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

Marinho, Juliane Aparecida.

Avaliação in vitro e in vivo da atividade antiplasmodial e citotoxicidade de novos compostos derivados de 4-aminoquinolinas / Juliane Aparecida Marinho. -- 2019.

174 f. : il.

Orientadora: Clarice Abramo

Coorientadora: Adilson David da Silva

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2019.

1. Malária. 2. Quimioterapia. 3. 4-aminoquinolinas. 4. Hidrazonas. 5. Iminas. I. Abramo, Clarice, orient. II. Silva, Adilson David da, coorient. III. Título.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha mãe que sempre esteve ao meu lado e me proporcionou, com muito carinho, a possibilidade de estudar.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por me conceder a vida por duas vezes e permitir que diante de tantas atribuições finalmente eu conseguisse chegar até aqui.

À minha mãe com tanto esforço e humildade permitiu que eu pudesse realizar esse sonho.

À minha Vó Maria que com tanto amor e carinho torcia por cada passo que eu dava e sempre me incentivou a estudar.

Ao meu pai Marcos que sempre me apoiou e nunca mediu esforços pra me ajudar. Ao meu amor Phill pela torcida e apoio.

Aos meus irmãos Julio, Jessyka e Isabelle, obrigada pelo carinho de sempre. Todas as etapas acadêmicas que vivi foram realizadas pensando em vocês. À D. Marinete e Sr. Joaquim pelo apoio incondicional.

À minha orientadora Dra. Clarice Abramo que me acolheu com tanto carinho e compreensão, que muito me ajudou tanto na parte científica como nas questões pessoais e de saúde. Além da confiança no meu trabalho soube compreender e me apoiar em cada decisão que foi tomada, uma verdadeira mãe.

Ao professor Adilson pela coorientação e contribuições importantes para o trabalho.

À Juliana Granato e Stephane Calixto por todo companheirismo, força e amizade!

À todas minhas amigas do Núcleo de Pesquisa em Parasitologia, em especial: Roberta, Daniela Renhe, Barbara Carpinter, Ayla Chagas, Luciana Antinarelli, Fernanda Valério, Patrícia de Almeida e Ana Evangelista que aguentaram todos os meus dramas e tornaram meus dias mais leves e alegres. Ao meu amigo Jean Marinho que muito me ajudou em vários momentos do trabalho, dando o sangue pela pesquisa!

Às professoras Florence e Elaine da Parasitologia, pelo incentivo e força durante todos esses anos.

À Carolina Brandi que com sua doçura compartilhou comigo o árduo trabalho de cuidado da cultura.

À Isabela Oliveira e Raissa Meinel por terem contribuído com os compostos do estudo e a avaliação dos resultados.

À Nicolli Belloti que esteve presente comigo desde o início, me ensinando os primeiros passos no estudo da quimioterapia antimalárica.

À Julia Penna Coutinho, Isabela Ceravolo, Antoniana Krettli agradeço a atenção e os ensinamentos proporcionados.

Ao professor Dr. Fernando Varotti por abrir as portas do seu laboratório e ter me acolhido diante das dificuldades com os testes *in vitro*. Agradeço pelos ensinamentos e profissionalismo. Ao Daniel M. Silqueira Guimarães, que muito me ajudou e tem ajudado, agradeço pelo carinho, paciência e amizade, além da colaboração nos testes de mecanismo de ação.

À professora Dra. Kézia Scopel agradeço por todas contribuições, ensinamentos e conselhos, desde a época do mestrado, foram essenciais para minha formação.

À professora Dra. Fabíola Dutra pelo apoio, incentivo e sugestões valiosas para o trabalho. À professora Dra. Flavia de Paoli e o técnico Carlos que muito contribuíram para realização das análises histológicas e foram muito receptivos e carinhosos comigo.

À professora Dra. Priscila V.S.Z. Capriles e sua aluna Lara de Azevedo Alves, que foram essenciais para realização dos estudos de *docking* molecular e elaboração das figuras.

Ao professor Marcos L. Gazarini e Alexandre Budu, por terem sido receptivos para realizar as análises sobre mecanismo de ação *in vitro*.

Agradeço a todos que de alguma forma me ajudaram e torceram para que este trabalho fosse concluído.

À Capes, Fapemig, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas e UFJF pelo apoio financeiro.

"O valor das metas futuras não reside na imagem do futuro que se cria na mente,
mas sim na mudança que elas provocam no presente".

David Allen

RESUMO

Com o surgimento de cepas resistentes de *Plasmodium*, novas estratégias terapêuticas são necessárias para o controle da malária. A utilização do anel 4-aminoquinolínico hibridizado a diferentes grupos químicos demonstrou ser uma técnica promissora para obter derivados com atividade, mesmo na presença de cepas resistentes. O objetivo deste trabalho foi avaliar novos candidatos a fármacos antimaláricos pela análise de propriedades físico-químicas, farmacocinéticas e docking molecular *in silico*, avaliação da citotoxicidade, mecanismo de ação *in vitro* e atividade antiplasmodial (*in vitro* e *in vivo*). Dois grupos de moléculas foram sintetizados a partir do anel 4-aminoquinolínico e conjugados a diferentes grupos aromáticos. O primeiro grupo, denominado H, apresenta uma hidrazona ligado ao anel 4 aminoquinolínico e o segundo grupo, denominado I, apresenta um grupo imina como substituinte, ambas com propriedades biológicas. As propriedades físico-químicas e o *docking* foram analisados por meio de ferramentas computacionais. Os parâmetros de citotoxicidade foram avaliados em eritrócitos humanos, células epiteliais de rim de macaco (VERO) e fibroblastos de pulmão humano (WI26VA4). A atividade antiplasmodial contra *P. falciparum* W2 foi realizada pela técnica de ELISA-HRP II. Possíveis alterações no vacúolo digestivo do parasito foram observadas por microscopia confocal. Finalmente, a atividade antimalárica *in vivo* foi determinada pelo teste supressivo de Peters, realizado em camundongos infectados com *P. berghei* NK65 e tratados com os candidatos a fármacos. Em geral, os dados *in silico* mostraram que as moléculas apresentaram boa predição físico-química e farmacocinética, não são carcinogênicas e são classificadas na categoria III de toxicidade aguda oral. No teste de hemólise verificou-se que nenhum candidato a fármaco promoveu mais de 10% de lise das células. Ademais, os derivados apresentaram baixa citotoxicidade, e foram seletivos aos parasitos. A avaliação *in vitro* da influência das moléculas no pH do vacúolo permitiu observar que I6 e I7 promovem aumento do pH interno da organela, o que coincidiu com os efeitos farmacológicos observados com a adição de drogas padrão, como o artesunato. Em relação à atividade *in vivo*, o tratamento com I6 e I7 resultou em valores importantes de IMP no 5º dia após a infecção (I6 15 mg/kg = 72,64% e I7 15 mg/kg = 71,15% e 25 mg/kg = 93,7%) . No 9º d.p.i houve redução na atividade de ambos derivados, porém I7 ainda apresentava ativo. O processo de síntese da série de derivados 4-aminoquinolínicos deste estudo foi promissor, especialmente no grupo I, produzindo moléculas com atividade antiplasmodial. Palavras chaves: malária, quimioterapia, 4-aminoquinolinas, hidrazonas, iminas.

ABSTRACT

With the emergence of resistant strains of *Plasmodium* the new therapeutic strategies are necessary for malaria control. The use of the hybridized 4-aminoquinoline ring with different chemical groups has been shown to be a promising technique to obtain benefits from activity, even in the presence of resistant strains. The objective this study was to evaluate new candidates for antimalarial drugs by the analysis of physicochemical, pharmacokinetic and molecular *docking in silico*, cytotoxicity, mechanism of action *in vitro* and antiplasmodial activity (*in vitro* and *in vivo*). Two groups of molecules were synthesized from the 4-aminoquinoline ring and conjugated to different aromatic groups. The first group, designated H, has a hydrazone attached to the 4-aminoquinoline ring, and the second group, designated I, it has an imine group as the substituent, both having biological properties. Physical-chemical properties and *docking* were analyzed using computational tools. Cytotoxicity parameters were evaluated in human erythrocytes, VERO - kidney epithelial cells and WI26VA4 human fibroblasts. The antiplasmodial activity against *P. falciparum* W2 was performed by the HRP-II-ELISA technique. Possible alterations in the digestive vacuole of the parasite were observed by confocal microscopy. Finally, *in vivo* antimalarial activity was determined by the Peters suppressive test, performed on *P. berghei* NK65 infected mice and treated with the derivatives. Most of all, *in silico* data showed that the molecules had good physicochemical and pharmacokinetic prediction, they are non-carcinogenic and no classified in category III acute oral toxicity. In the hemolysis test, it was found that no derivative promoted more than 10% cell lysis. In addition, the derivatives showed low cytotoxicity, and were selective to the parasites. The *in vitro* evaluation of the molecules influence on the vacuole pH showed that I6 and I7 promoted an increase in the internal pH of the organelle that coincided with the pharmacological effects of artesunate, which is standard drug. In relation to the *in vivo* activity, I6 and I7 obtained important values of IMP on the 5th day after infection (I6 15 mg/kg = 72.64% and I7 15 mg/kg = 71.15% and 25 mg/kg = 93,7%). In the 9th d.p.i there was reduction in the activity of both derivatives, but I7 maintained its activity. It was observed that the synthesis process of the series of 4-aminoquinoline derivatives of this study was promising, especially in group I, producing molecules with antiplasmodial activity. Key words: malaria, chemotherapy, 4-aminoquinolines, hydrazones, imines.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Países endêmicos em malária entre os anos 2000 e 2015	22
Figura 2: Progresso na redução dos casos nativos de malária entre os anos de 2000 e 2017	23
Figura 3: Casos de malária confirmados nas Américas em 2017.....	24
Figura 4: Mapa de risco de transmissão de malária por município em 2017.....	27
Figura 5: Liberação dos merozoítos hepáticos na corrente sanguínea e ciclo eritrocítico de <i>Plasmodium</i>	29
Figura 6: Ciclo biológico dos plasmódios no ser humano.....	32
Figura 7: Medicamentos comumente usados para tratamento de malária	42
Figura 8: Estrutura química da cloroquina.....	45
Figura 9: Mecanismo de ação da cloroquina.....	47
Figura 10: Delineamento experimental. Fonte: Próprio autor	65
Figura 11: Estrutura tridimensional da enzima PfLDH contendo substrato oxamato e cofator NAD.....	70
Figura 12: Representação do <i>docking</i> entre o controle cloroquina (A), artesunato (B), mefloquina (C), H1 (D) e a enzima PfLDH	98
Figura 13: Representação do <i>docking</i> entre o derivado 4-aminoquinolínico H2 (E), H3 (F), H4 (G), H5 (F) e a enzima PfLDH	99
Figura 14: Representação do <i>docking</i> entre o derivado 4-aminoquinolínico composto I1 (I), I2 (J), I3 (K), I4 (L) e a enzima PfLDH.....	100
Figura 15: Representação do <i>docking</i> entre o derivado 4-aminoquinolínico I5(M), I6 (N), I7 (O) e a enzima PfLDH. Posicionamento dos derivados no sítio ativo da enzima (P).....	101
Figura 16: Percentual de hemólise após a adição dos derivados com substituintes hidrazonas (grupo H) na concentração de 150 μ M	102
Figura 17: Percentual de Hemólise após a adição dos derivados com substituintes iminas (Grupo I) até na concentração de 150 μ M	103
Figura 18: Microscopia confocal (objetiva 64X) para avaliação da atividade do antimalárico padrão artesunato	113
Figura 19: Microscopia confocal (objetiva 64x) para avaliação do derivado I6.....	113

Figura 20: Microscopia confocal (objetiva 64X) para avaliação da atividade do derivado I7.....	113
Figura 21:Decaimento da intensidade média de fluorescência (medida em UA - unidades arbitrárias) ao longo do tempo	114
Figura 22: Análise do ganho de massa corpórea dos animais tratados com I6.....	116
Figura 23: Análise do ganho de massa corpórea dos animais tratados com I7.....	117
Figura 24: Análise da sobrevivência em dias dos animais tratados com cloroquina, artesunato e mefloquina (AS+MQ), e I6 por 30 dias. Fonte: próprio autor.	118
Figura 25: Análise da sobrevivência em dias dos animais tratados com cloroquina, artesunato e mefloquina (AS+MQ) e I7 (15mg/kg, 25mg/kg, 50mg/kg) por 30 dias. Fonte: próprio autor.....	118
Figura 26: Alterações na morfologia do tecido hepático de animais infectados com <i>P. berghei</i> NK65, observadas com os tratamentos.....	120
Figura 27: Alterações na morfologia do tecido esplênico de animais infectados com <i>P. berghei</i> NK65, observadas com os tratamentos.	121
Figura 28: Relação estrutura-atividade dos compostos 4-aminoquinolínicos.	136

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores de concentração para análise de toxicidade aguda oral.....	58
Tabela 2: Fórmulas estruturais dos derivados sintetizados por duas rotas sintéticas distintas. Os derivados cuja hibridização foi realizada com grupamento hidrazona, pertence ao grupo H, e os que tiveram o processo de hibridização pelo grupamento imina, pertencem ao grupo I.....	67
Tabela 3: Avaliação <i>in silico</i> através da regra dos 5 de Lipinski, das propriedades físico-químicas das moléculas sintéticas derivadas de 4-aminoquinolinas, com substituinte hidrazona. Resultados obtidos pelo programa <i>Molinspiration online</i>	89
Tabela 4: Avaliação <i>in silico</i> das propriedades físico-químicas das moléculas sintéticas derivadas de 4-aminoquinolinas, com substituinte imina. Resultados obtidos pelo programa <i>Molinspiration online</i>	90
Tabela 5: Avaliação <i>in silico</i> das propriedades farmacocinéticas das moléculas sintéticas derivadas de 4-aminoquinolinas através do programa AdmetSar.	92
Tabela 6: Estudos de <i>docking</i> molecular entre os derivados quinolínicos dos grupos H e I com a proteína LDH de <i>P. falciparum</i>	95
Tabela 7: Avaliação da citotoxicidade dos derivados 4-aminoquinolínicos do grupo H (CC ₅₀) em células Vero e WI26VA4.....	105
Tabela 8: Avaliação da citotoxicidade dos derivados 4-aminoquinolínicos do grupo I (CC ₅₀) em células Vero e WI26VA4.....	106
Tabela 9: Avaliação da atividade antiplasmodial <i>in vitro</i> dos derivados hibridizados com os grupos hidrazona por meio da técnica de ELISA-HRP II e cálculo do índice de seletividade (IS).....	109
Tabela 10: Avaliação da atividade antiplasmodial <i>in vitro</i> dos derivados hibridizados com os grupos imina, por meio da técnica de ELISA-HRP II e cálculo do índice de seletividade (IS).....	110
Tabela 11: Valores de inibição da multiplicação do parasito, após teste supressivo com os derivados I6 e I7	115

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

μg - micrograma

μL - microlitro

μM - micromolar

ACT- terapia combinada com a artemisinina

ADMET- absorção, distribuição, metabolismo, excreção, toxicidade

ALT- alanina aminotransferase

ANOVA- análise de variância

ANVISA- agência nacional de vigilância sanitária

AQ- amodiaquina

ART- artesunato

AST- aspartato aminotransferase

BGM- *buffalo green monkey*

CC₅₀- concentração que reduz a viabilidade celular em 50%

CI₅₀- concentração inibitória que reduz o crescimento do parasito em 50%

cKi- constante de inibição calculado

CO₂- gás carbônico

CQ- cloroquina

CSP ou CS- proteína circunsporozoíta

CYP450- citocromo P450

D.p.i- dia(s) pós-infecção

DDT- dicloro-difeniltricloroetano

DHA- dihidroartemisinina

DL50- dose letal mediana (para 50% dos animais)

DMSO- dimetilsulfóxido

DNA- ácido desoxirribonucleico

ELISA- ensaio de imun absorção enzimática

EPA - *United States environmental protection agency*

FAPEMIG- Fundação de amparo à pesquisa do estado de Minas Gerais

FQ- ferroquina

G6PD- glicose 6-fosfato desidrogenase

HC₅₀ - concentração capaz de provocar lise de 50% das hemácias

HIV- vírus da imunodeficiência adquirida

HRPII- proteína rica em histidina 2

IL-1- interleucina 1

Ki- constante de inibição

Log P- coeficiente de partição óleo-água

MOPS- *morpholinopropanesulfonic acid*

MQ- mefloquina

MTT- 4,5-dimetiltiazol-2-il)2-5-difenil tetrazólico

NOD- *NOD like receptors*

nOH- número de grupos aceptores de ligações de hidrogênio

nOHNH- número de grupos doadores de ligação de hidrogênio

NUPEP- núcleo em pesquisas em parasitologia

NUPEQ- núcleo de pesquisas químicas

OMS- Organização Mundial da Saúde

OPAS- Organização Panamericana de Saúde

PDB- *protein data bank*

PfEMP1- proteína de membrana eritrocitária 1

pfmdr1- proteína 1 de resistência a múltiplos fármacos

Pgh1- homólogo 1 da glicoproteína P

pH- potencial hidrogênionico

pLDH- proteína lactato desidrogenase

PMSF- *phenylmethylsulfonyl fluoride*

RPMI- *Roswell Park Memorial Institute*

SDRA- síndrome do desconforto respiratório agudo

SFB- Soro fetal bovino

TMB- 3,3,5, - *tetramethylbenzidine*

TNF- α - fator de necrose tumoral

TOLL – *Toll like receptors*

TPSA- área superficial topológica polar

TRAP- trombospondina

UA- unidades arbitrárias

WHO- *World health organization*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 A MALÁRIA NO MUNDO	21
1.2 BREVE HISTÓRICO DA MALÁRIA NO BRASIL	24
1.3 CICLO BIOLÓGICO DOS PLASMÓDIOS HUMANOS	28
1.4 ASPECTOS IMUNOPATOGÊNICOS RELACIONADOS AO PLASMÓDIO	33
1.4.1 ALTERAÇÕES HEPATOESPLÊNICAS	36
1.5 IMUNIDADE E VACINAS	37
1.6 ESTRATÉGIAS DE CONTROLE DA MALÁRIA	40
1.7 QUIMIOTERAPIA ANTIMALÁRICA	41
1.7.1 PRINCIPAIS ANTIMALÁRICOS	43
1.7.1.1 QUININA	43
1.7.1.2 CLOROQUINA	45
1.7.1.3 OUTROS DERIVADOS AMINOQUINOLÍNICOS	49
a) Amodiaquina	49
b) Mefloquina	49
1.7.1.4 8-AMINOQUINOLINAS: PRIMAQUINA E TAFENOQUINA	50
1.7.1.5 ARTEMISININA E SEUS DERIVADOS	51
1.8 MALÁRIA E DESENVOLVIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS	53
1.8.1 AVALIAÇÃO <i>IN SILICO</i> DE NOVOS CANDIDATOS À FÁRMACOS	53
1.8.1.1 PROPRIEDADES FARMACOCINÉTICAS DE NOVOS CANDIDATOS À FÁRMACOS	53
1.8.1.2 MODELOS DE <i>DOCKING</i> MOLECULAR	59
1.8.2 OBTENÇÃO DE NOVOS COMPOSTOS SINTÉTICOS POR TÉCNICAS DE HIBRIDIZAÇÃO MOLECULAR	60
2 JUSTIFICATIVA	63

3 OBJETIVO GERAL	64
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	64
4 MATERIAL E MÉTODOS	65
4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	65
4.2 SÍNTESE DOS DERIVADOS 4-AMINOQUINOLÍNICOS	66
4.2 ESTUDOS <i>IN SILICO</i> DOS DERIVADOS TESTADOS.....	68
4.2.1 ANÁLISE DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DOS DERIVADOS TESTADOS.....	68
4.2.2 AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES FARMACOCINÉTICAS DOS DERIVADOS.....	69
4.2.3. ESTUDOS DE <i>DOCKING</i> MOLECULAR PARA AVALIAR POSSÍVEL MECANISMO DE AÇÃO DOS DERIVADOS <i>IN SILICO</i>	69
4.2.3.1 MODELAGEM MOLECULAR.....	69
4.2.3.2 DOCKING PROTEÍNA-LIGANTE.....	70
4.2.3.3 PREPARO DA PROTEÍNA	71
4.2.3.4 PREPARO DOS LIGANTES	71
4.2.3.5 PREPARO DA <i>GRID</i>	71
4.2.3.5 <i>DOCKING</i> RECEPTOR-LIGANTE	72
4.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA DOS DERIVADOS QUINOLÍNICOS TESTADOS.....	72
4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DOS DERIVADOS TESTADOS.....	74
4.4.1 CULTURA DE CÉLULAS VERO.....	74
4.4.2 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS VERO.....	75
4.4.3 CULTURA DE CÉLULAS WI26VA4.....	76
4.4.4 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS WI26VA4.....	77
4.5. AVALIAÇÃO ANTIPLASMODIAL <i>IN VITRO</i> DOS DERIVADOS QUINOLÍNICOS TESTADOS.....	78
4.5.1 CULTURA <i>IN VITRO</i> DE <i>P. falciparum</i> (CEPA W2)	78

4.5.2	TESTE DE AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMALÁRICA <i>IN VITRO</i> PELO ENSAIO DE HRPII (PROTEÍNA 2 RICA EM HISTIDINA).....	79
4.6.	CÁLCULO DO ÍNDICE DE SELETIVIDADE	80
4.7.	ENSAIO DE COLOCALIZAÇÃO POR MICROSCOPIA CONFOCAL PARA VERIFICAÇÃO DE ALTERAÇÃO DO PH DO VACUOLO PÓS TRATAMENTO <i>IN VITRO</i>	81
4.8	AVALIAÇÃO DA POTENCIAL ATIVIDADE ANTIMALÁRICA <i>IN VIVO</i> DOS DERIVADOS 4-AMINOQUINOLÍNICOS TESTADOS.....	83
4.8.1	ANIMAIS	83
4.8.2	CEPA DE <i>Plasmodium berghei</i> NK65.....	83
4.8.3	SOLUBILIZAÇÃO DOS DERIVADOS PARA O TESTE <i>IN VIVO</i>	84
4.8.4	TESTE SUPRESSIVO	84
4.8.5	ANÁLISE DA INIBIÇÃO DA MULTIPLICAÇÃO DO PARASITO (IMP).....	85
4.9	ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA REPRESENTATIVA DO BAÇO E FÍGADO DOS CAMUNDONGOS TRATADOS.....	85
4.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	87
5	RESULTADOS	88
5.1	AVALIAÇÃO <i>IN SILICO</i> DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DOS DERIVADOS DE 4-AMINOQUINOLINAS.....	88
5.2	AVALIAÇÃO <i>IN SILICO</i> DAS PROPRIEDADES FARMACOCINÉTICAS DOS DERIVADOS 4-AMINOQUINOLÍNICOS.....	91
5.3	ESTUDOS DE <i>DOCKING</i> MOLECULAR ENTRE OS DERIVADOS 4-AMINOQUINOLÍNICOS E PROTEÍNA LDH PLASMODIAL.....	95
5.4	AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS DERIVADOS DE 4-AMINOQUINOLINAS EM ERITRÓCITOS HUMANOS	102
5.5	ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE EM DIFERENTES CULTURAS DE CÉLULAS.....	104
5.6	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPLASMODIAL <i>IN VITRO</i> ATRAVÉS DA TÉCNICA DE ELISA-HRPII.....	108

5.7 AVALIAÇÃO DE ALTERAÇÕES NO PH DO VACUOLO DIGESTIVO DOS PARASITOS APÓS TRATAMENTO <i>IN VITRO</i>	112
5.8 AVALIAÇÃO DA POTENCIAL ATIVIDADE ANTIMALÁRICA <i>IN VIVO</i> DOS DERIVADOS 4-AMINOQUINOLÍNICOS I6 E I7.....	115
5.9 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DE BAÇO E FÍGADO DE CAMUNDONGOS TRATADOS COM OS DERIVADOS TESTADOS.....	119
6 DISCUSSÃO	122
6.1 HIDRAZONAS E IMINAS.....	122
6.2 ANÁLISES <i>IN SILICO</i>	124
6.3 ANÁLISE DOS ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE	131
6.4 ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIPLASMODIAL <i>IN VITRO</i>	133
6.4 ANÁLISE DO PH DO VACÚOLO DIGESTIVO	137
6.5 TESTE <i>IN VIVO</i>	138
7 CONCLUSÃO.....	143
8 REFERÊNCIAS.....	144
ANEXO 1.....	168
PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISAS COM SERES HUMANOS... 168	
ANEXO 2.....	172
PROTOCOLO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISAS COM ANIMAIS (ANIMAIS DE MANUTENÇÃO).....	172
ANEXO 3.....	173
PROTOCOLO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISAS COM ANIMAIS (ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO).....	173
ANEXO 4.....	174
PRORROGAÇÃO DO PRAZO DO PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM ANIMAIS.....	174

1 INTRODUÇÃO

O reino protista é constituído por um grupo diversificado de seres vivos e muitos deles são parasitos responsáveis por diversas infecções humanas. Faz parte desse o superfilo Alveolata, que possui organismos de importância médica e que parasitam uma grande variedade de hospedeiros vertebrados e invertebrados. Exemplos desse grupo são os seres que pertencem aos gêneros *Toxoplasma*, *Cryptosporidium* e *Plasmodium* (MATUSCHEWSKI et al., 2002, ANTINORI et al., 2012).

As espécies do gênero *Plasmodium* são responsáveis por uma das doenças que mais causa morbidade e mortalidade ao redor do mundo, a malária, também conhecida como paludismo, febre palustre, maleita. A população residente em regiões tropicais e subtropicais corre maior risco de adquirir a infecção, uma vez que as condições ambientais favorecem a propagação do inseto vetor (ASHLEY et al., 2018). Apesar de sua presença ser expressiva nestas regiões, o mosquito está distribuído em todo globo terrestre (PHILLIPS et al., 2017). O continente africano é o mais acometido pela infecção e nele as espécies mais comuns são: *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. ovale* (HOWES et al., 2016), sendo que a primeira é responsável pela maioria dos casos descritos. *P. vivax* representa 74,1% dos casos nas Américas (WHO, 2018), as outras espécies encontradas são *P. malariae* e *P. falciparum* (WHO, 2017). A literatura descreve também a infecção humana por *P. knowlesi* (COX-SINGH et al., 2008). Outras espécies de parasitos símeos têm sido relacionadas à infecção em humanos como *P. simiovale*, *P. cinomolgy*, *P. brasilianum* entre outras (ANTINORI et al., 2012).

Os transmissores dessa parasitose são as fêmeas dos mosquitos do gênero *Anopheles*, conhecidos popularmente como “carapanã”, “muriçoca”, “sovela”, “mosquito-prego” e “bicuda” (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016). Os vetores habitam locais de temperatura e umidade elevadas que favorecem a sua reprodução e a disseminação no ambiente. Nas fêmeas ocorre parte do ciclo biológico e nelas não é observada nenhuma manifestação patológica da presença do parasito (CDC, 2019).

A principal forma de infecção ocorre pela picada do inseto vetor durante o repasto sanguíneo. Esse hábito é mais frequente no período da manhã e ao anoitecer, mas pode variar conforme a espécie do inseto, local e período do ano.

Apesar da transmissão vetorial pela picada ser a mais comum, há outras formas de transmissão relatadas como compartilhamento de material perfuro-cortante contaminado, transfusão sanguínea e transmissão entre mãe e filho, porém são observações raras (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

1.1 A MALÁRIA NO MUNDO

Há centenas de anos a malária estava presente em grande parte do planeta, mas aos poucos foi eliminada em regiões como América do Norte, Europa e Austrália desde o século XX. Isso foi possível devido a diversas ações de saúde desenvolvidas nesses locais, como uso da cloroquina como droga padrão para tratamento e uso do inseticida dicloro-difeniltricloroetano (DDT) (WHO, 2011).

Com o avançar dos anos e o sucesso da quimioterapia antimalárica, os números globais de incidência da doença foram reduzidos drasticamente em diversas partes do mundo. Entre 1988 e 2012 houve uma queda de 95% nos casos de mortalidade relacionada ao uso da terapia combinada com artemisinina (do inglês: ACT, *Artemisinin Combined Therapy*). Essa terapêutica foi muito eficaz para o combate à doença, porém atualmente tem sido prejudicada devido ao surgimento de cepas resistentes aos fármacos (WHO, 2017).

Apesar dos esforços realizados por diversos países, a malária ainda existe em muitas regiões do planeta, sendo endêmica em algumas delas (figura 1). Estima-se que 3,2 bilhões de pessoas vivem em regiões de risco de transmissão da doença (OPAS, 2016). Diante desse panorama diversas intervenções e trabalhos ainda devem ser realizados para a contenção da malária (WHO, 2016).

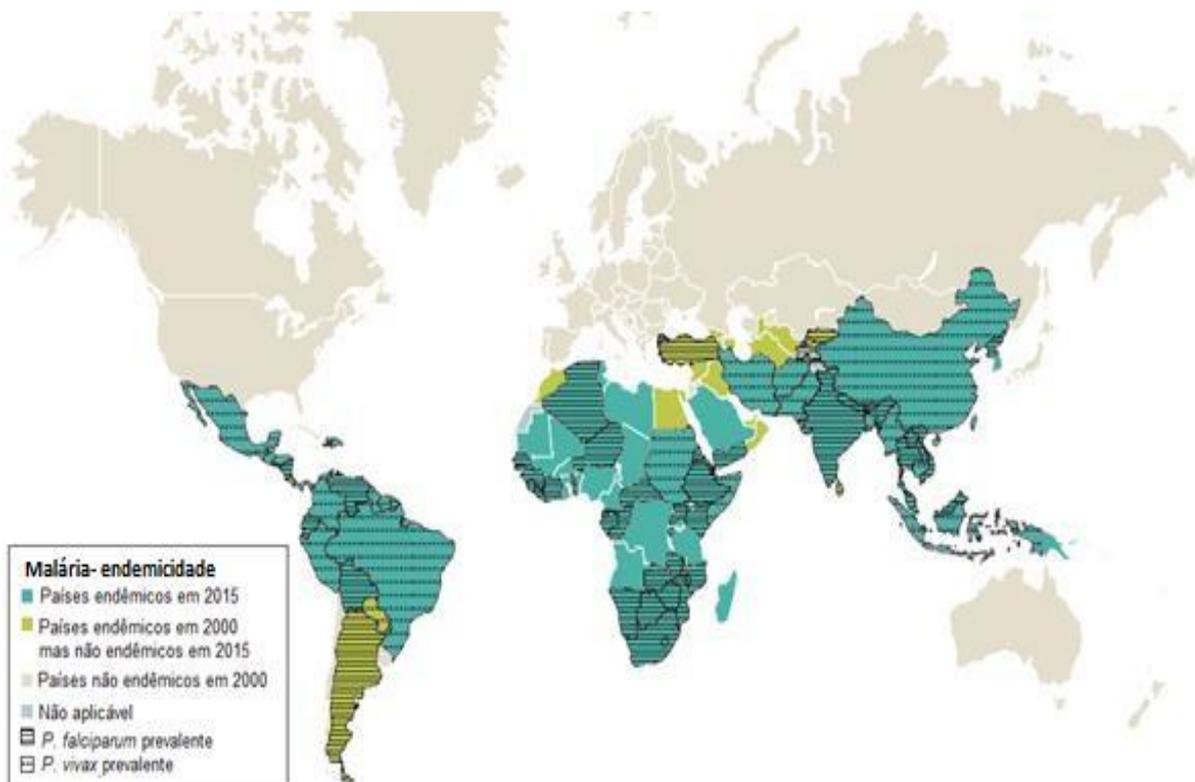


Figura 1: Países endêmicos em malária entre os anos 2000 e 2015. Espécies prevalentes em cada região. Adaptado de PHILLIPS et al. (2017).

Em países onde a malária ainda é uma doença persistente, crianças e gestantes são os grupos mais vulneráveis à doença na sua forma mais grave (WHO, 2016; WHO, 2018). Os dados da OMS mostram que em 2017 houve 219 milhões de casos de malária no mundo. Do total, 92% estavam presentes na África, 5% na região do sudeste asiático e 2% na região do mediterrâneo oriental (WHO, 2018). Foram estimados 435.000 óbitos relacionados à malária em todo mundo. O grupo de maior vulnerabilidade ainda é crianças com idade inferior a cinco anos, respondendo por 61% (266.000) das mortes, predominantemente na África (WHO, 2018).

Em publicação sobre a situação da malária no mundo em 2017, comparando com os dados de 2016, a OMS apontou um retrocesso no controle da doença com aumento no número de casos. Após esse período, a situação melhorou dando continuidade às metas de redução (Figura 2). Todas as regiões avaliadas pela OMS, exceto as Américas, apresentaram redução na mortalidade em 2017, quando comparadas a 2010. Globalmente a rede de parceiros que visam eliminar a malária está aumentando, com o objetivo de controlar a doença em 2020 em pelo

menos dez países onde era endêmica em 2015 (WHO, 2018).

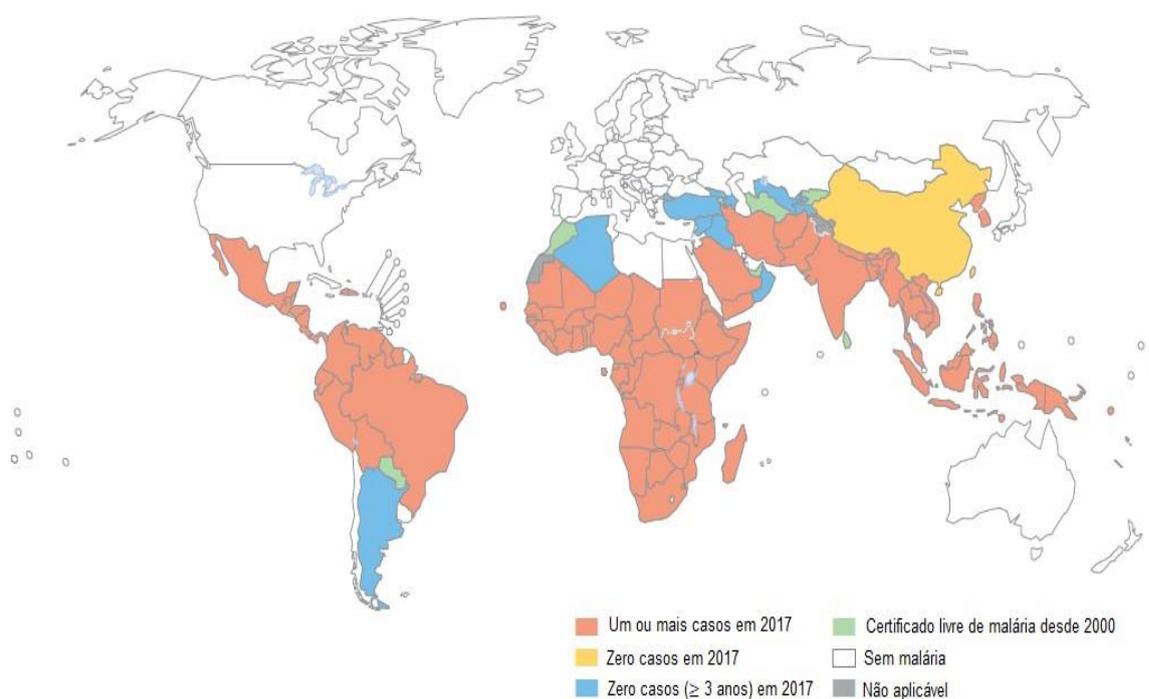


Figura 2: Progresso na redução dos casos nativos de malária entre os anos de 2000 e 2017.
Adaptado de WHO, 2018.

Nas Américas, 138 milhões de pessoas vivem em áreas de risco. Em 2017 foram contabilizados 773.500 casos confirmados e 87 mortes (figura 3) (WHO, 2018). Países como Brasil, Equador, México, Nicarágua e Venezuela mostraram aumento no número de casos (OPAS, 2018).

Medidas têm sido adotadas no sentido de evitar a disseminação da doença, como diagnóstico correto e imediato tratamentos dos pacientes, controle do inseto vetor (pelo uso de inseticidas, telas de proteção, repelentes, etc.) e pesquisa de vacinas contra malária (WHO, 2016).

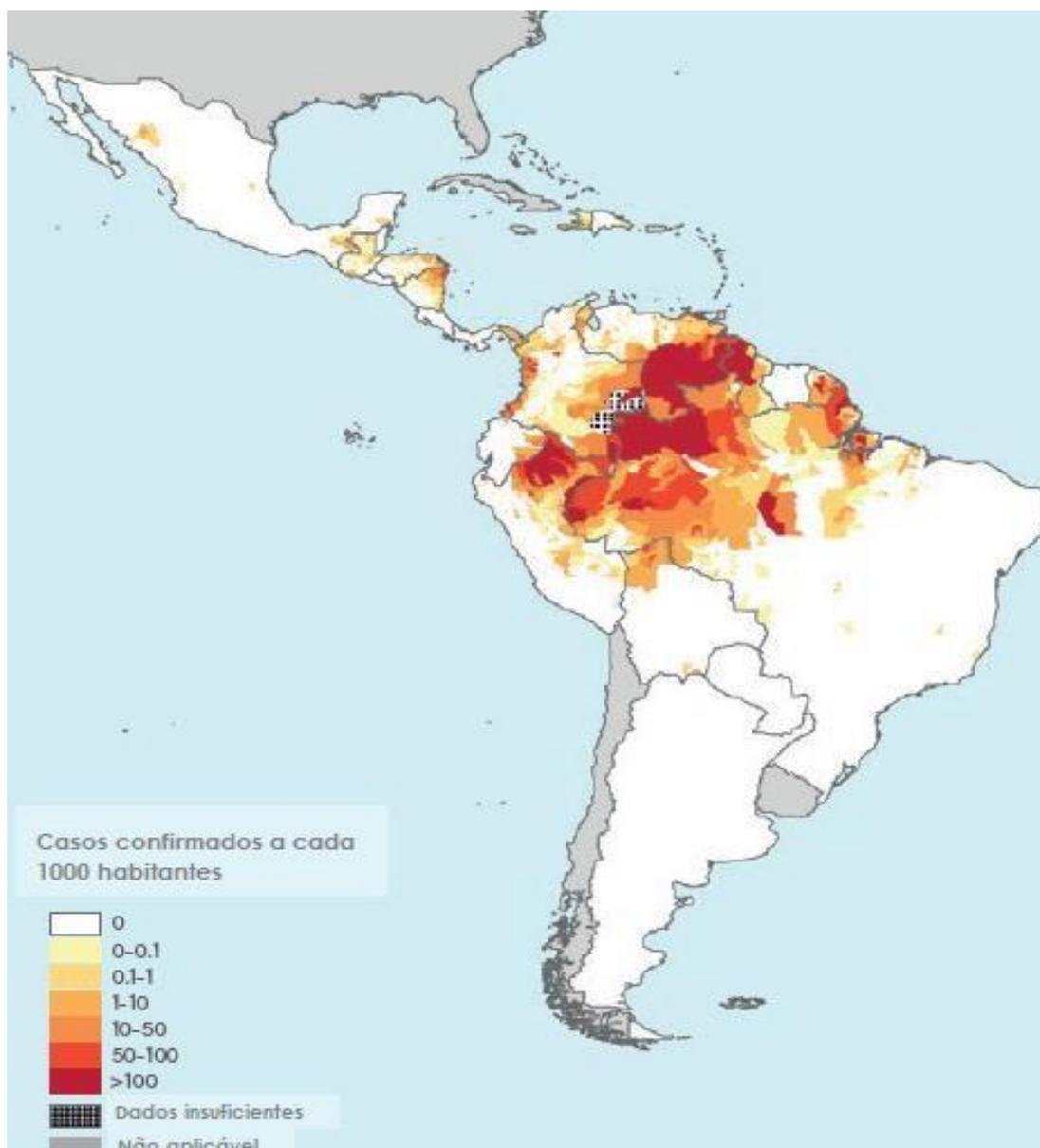


Figura 3: Casos de malária confirmados nas Américas em 2017.
Adaptado de WHO (2018).

1.2 BREVE HISTÓRICO DA MALÁRIA NO BRASIL

No final do século XIX, a malária estava presente em todo território brasileiro, porém de forma mais pronunciada na costa litorânea (CAMARGO, 2003). Por volta de 1930, o nordeste brasileiro teve um surto da doença decorrente da entrada do vetor *Anopheles gambiae* infectado, muito provavelmente em decorrência

do tráfego de navios entre a África e o Brasil (DEANE, 1992; CAMARGO, 2003, OLIVEIRA-FERREIRA et al. , 2010).

Na década de 1940, aproximadamente 40 milhões de brasileiros viviam em áreas endêmicas de malária e ocorriam muitas mortes anualmente. Nesse período existia em todo planeta uma intensa mobilização para a eliminação da doença com o uso do dicloro-difeniltricloroetano (DDT), o qual foi aplicado também no Brasil (FRANÇA et al., 2008 ; FERREIRA e CASTRO, 2016).

Em 1950, as campanhas para eliminação da doença adotaram o uso da cloroquina no sal de cozinha (conhecido como: “sal cloroquinado”), com o objetivo de ajudar na profilaxia da doença, conduta conhecida como Método Pinotti (PINOTTI, DAMASCENO, SOARES, 1955). Esta mobilização se estendeu até 1970 e conseguiu eliminar a doença em algumas regiões do país, como sul, sudeste, nordeste e parte da região oeste do Brasil. Entretanto, a região amazônica ainda apresentava muitos casos da doença (OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010; LOIOLA, SILVA, TAUIL, 2002). Alguns fatores, ainda analisados, foram atribuídos ao surgimento de cepas resistentes, como o extensivo uso do sal-cloroquinado no país e, uma vez que não havia controle para o uso desta substância (SÁ, 2011).

Os problemas para eliminar a malária no território amazônico podem ser atribuídos às diferentes características ambientais e de infraestrutura do local. Grande parte das moradias dessa região tinha em comum a presença de superfícies de difícil absorção do inseticida, isso somado à elevada umidade da floresta, favorecia a multiplicação do vetor. Outro agravamento seria a presença de trabalhadores em áreas de floresta que contribuía de forma significativa para o insucesso da campanha na região (LOIOLA, SILVA, TAUIL, 2002).

Após o início do regime militar na década de 1960, ações governamentais foram realizadas na região amazônica como construção de rodovias, locais de mineração e extração de madeiras, fazendas de criação de animais e atividades agrícolas, o que levou ao aumento da imigração de indivíduos provenientes das regiões sul, sudeste e nordeste, resultando em aumentos expressivos da população na região da Amazônia Legal até 1991 (LOIOLA, SILVA, TUIL, 2002; CAMARGO, 2003). Nessa época foi estabelecido o conceito de malária de fronteira (SAWER, 1988; FERREIRA e CASTRO, 2016) para caracterizar a transmissão da infecção de

padrão temporal na Amazônia, principalmente relacionada às formações de assentamentos, juntamente com o desmatamento em áreas de encontro do vetor *Anopheles*, moradias precárias e falta de imunidade adquirida dos imigrantes, ocasionando a morte de diversas pessoas (CAMARGO, 2003).

Após este período, houve redução na transmissão com a melhora das moradias e condições de acesso à saúde e, em seguida, uma estabilização em relação ao número de casos na região. Posteriormente, em 1980, o Brasil enfrentou grandes problemas econômicos que influenciaram o cenário da saúde, e que coincidiu com um aumento de até 10 vezes nos casos de malária (FERREIRA, CASTRO, 2016). Em 1999 foram registrados cerca de 630.000 casos da infecção e, a partir de 2001, esse número foi reduzido para cerca de 383.000, fruto das políticas governamentais que foram realizadas (LOILA, SILVA, TAUIL, 2002).

Os percentuais de redução no número de casos que acontecia em todo mundo também foi observado no Brasil entre os anos de 2000 a 2014 (OPAS, 2016). Em recente atualização dos dados sobre a epidemiologia da doença realizada pela Organização Panamericana de Saúde, foi apresentado que entre 2016 e 2017 esse panorama de redução mudou, passando de 117.832 casos de doença na região amazônica para 174.522, representando um aumento de 48%, com prevalência no estado do Amazonas e depois no Pará. Em virtude do exposto, a recomendação da instituição é que as ações de vigilância sanitária e controle da malária sejam reforçados nos próximos anos (OPAS, 2018).

Casos de malária na região extra-amazônica também têm sido relatados nos estados de Alagoas, Bahia, Goiás, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraíba, Paraná, Pernambuco, Piauí, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, São Paulo, Sergipe e partes do Maranhão, Tocantins e Mato Grosso. São considerados casos de malária importada (quando a infecção foi adquirida em outro ambiente, ex: viajantes), introduzida (resultada da chegada de um indivíduo parasitado em uma área propícia) e autóctone (quando a doença se manifesta em local onde existe a fonte de infecção). Os casos autóctones respondem pela menor fração e têm sido registradas nas regiões de mata-atlântica devido à presença de vetores, clima e ambiente adequados (PINA-COSTA et al., 2014).

A região de maior transmissão continua a ser a região norte, porém devido aos casos em regiões como centro-norte e sudeste, estas também são consideradas áreas de transmissão (figura 4) de acordo com o Ministério da Saúde (2017).

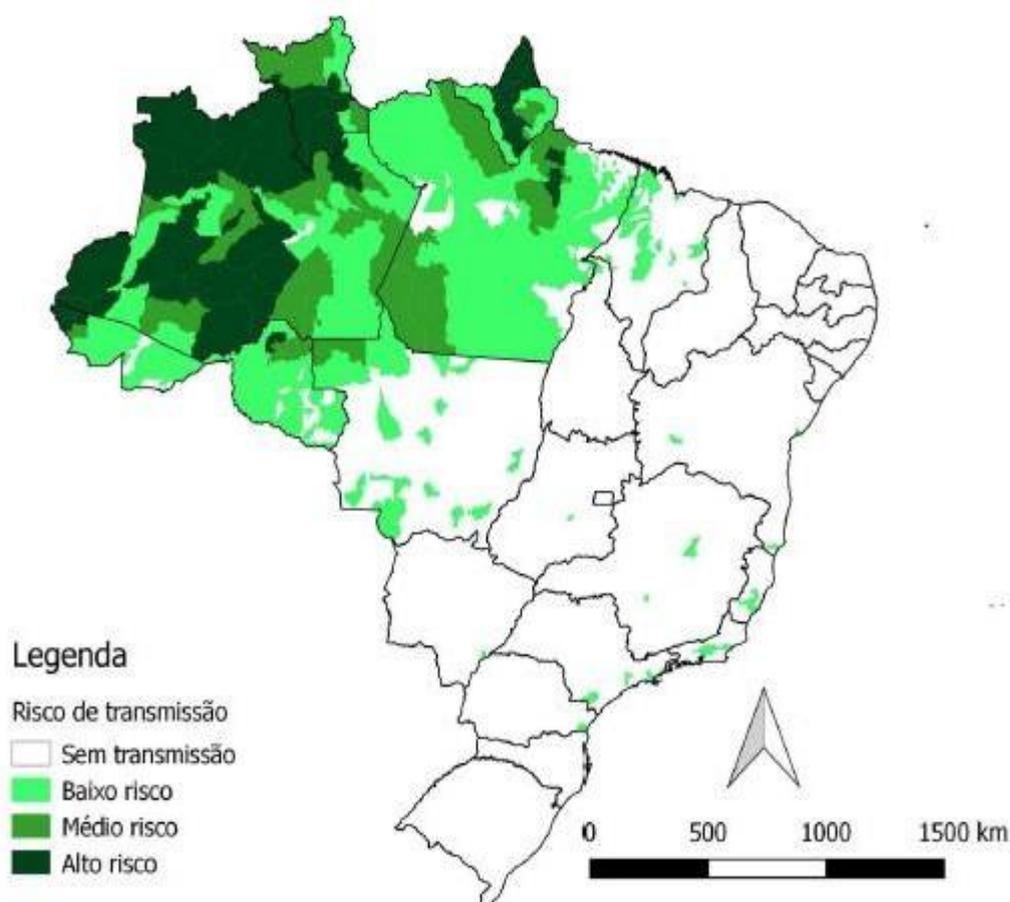


Figura 4: Mapa de risco de transmissão de malária por município em 2017.

Fonte: Sinan/SVS/MS e Sivep-Malária/SVS/MS (2017).

P. vivax é a espécie predominante no Brasil e este fato pode ser explicado por razões biológicas que tornam essa espécie menos responsiva as estratégias de controle do que *P. falciparum*. Um exemplo é a existência de formas latentes do parasito no fígado (WHITE, 2011; WHITE, 2014, CHENG et al., 2015,). Outro fator relacionado seria a infecção por *P. vivax* apresentar, em geral, carga parasitaria baixa, o que representaria maior dificuldade para se obter o diagnóstico (CHENG et al., 2015). A intensa produção de gametócitos nas fases iniciais antes do início do tratamento também pode facilitar a transmissão para novos vetores (FERREIRA;

CASTRO, 2016). Apesar da importância dessa espécie no país a malária vivax tem sido negligenciada e as pesquisas são mais direcionadas a *P. falciparum*.

1.3 CICLO BIOLÓGICO DOS PLASMÓDIOS HUMANOS

O ciclo biológico dos plasmódios é bastante complexo, envolvendo um hospedeiro invertebrado, representado por mosquitos fêmeas do gênero *Anopheles* e um hospedeiro vertebrado, como o homem, por exemplo (ASHLEY et al., 2018).

No mosquito, as formas evolutivas denominadas esporozoítos migram para as glândulas salivares e durante o repasto sanguíneo são inoculados na pele do ser humano. Cerca de dez a cem parasitos na forma de esporozoítos adentram a pele e podem permanecer na região por algumas horas ou mesmo dias (GUEIRARD et al., 2010). Estas formas podem atravessar o endotélio vascular e alcançar a corrente sanguínea, ou ainda podem ser drenadas para linfonodos (AMINO et al., 2006) e atravessar diversas células (MOTA et al., 2001).

Morfologicamente os esporozoítos são formas evolutivas propensas à migração para tecidos e invasão dos hepatócitos, uma vez que são células extremamente móveis, alongadas e curvadas que permitem sua motilidade. Possui membrana plasmática rígida associada às cisternas de membrana, que juntamente com as roptrias e os micronemas, facilitam sua entrada na célula hospedeira (MORISSETE e SIBLEY, 2002; JAYABALASINGHAM, et al., 2010).

Ao alcançarem os hepatócitos, os parasitos são capazes de dar continuidade ao ciclo, sendo este denominado ciclo exo-eritrocítico, por ocorrer fora dos eritrócitos (MATUSCHEWSKI et al., 2002). Esta fase, dependendo da espécie, pode durar até dezesseis dias (PRUDÊNCIO et al., 2011; ASHLEY et al., 2018). Um único esporozoíto pode dar origem a dezenas de merozoítos, por um processo de reprodução assexuada denominada esquizogonia (PHILLIPS et al., 2017).

Os plasmódios invadem as células hepáticas através da interação de domínios da proteína circunsporozoíta (CSP) e da proteína adesiva relacionada a trombospondina (TRAP), ambas do parasito, (SULTAN et al., 1997) com

proteoglicanos sulfato de heparina presente nas células do fígado (LEITE et al.; 2013; FREVERT et al, 1993). No processo invasivo ocorre uma junção íntima entre o plasmódio e a célula hospedeira; ele se projeta para dentro dela, levando a uma invaginação da membrana plasmática que, posteriormente, é remodelada por proteínas do parasito dando origem ao vacúolo parasitóforo. No interior desse ocorre o desenvolvimento de milhares de merozoítos, por meio de inúmeras mitoses do plasmódio. Em seguida ocorre o desenvolvimento das demais organelas e a membrana plasmática dos esquizontes é utilizada para a formação das membranas dos merozoítos. Nos hepatócitos os merozoítos permanecem no interior de estruturas chamadas de merossomas (STURM et al., 2009; YAM e PREISER, 2017), vesículas que posteriormente são liberadas no sangue. Com o rompimento da membrana dos merossomas os merozoítos podem invadir hemácias (MILLER *et al.*, 2002) dando início ao ciclo eritrocítico (figura 5), responsável pela patologia associada à malária (MOTA, 2008).

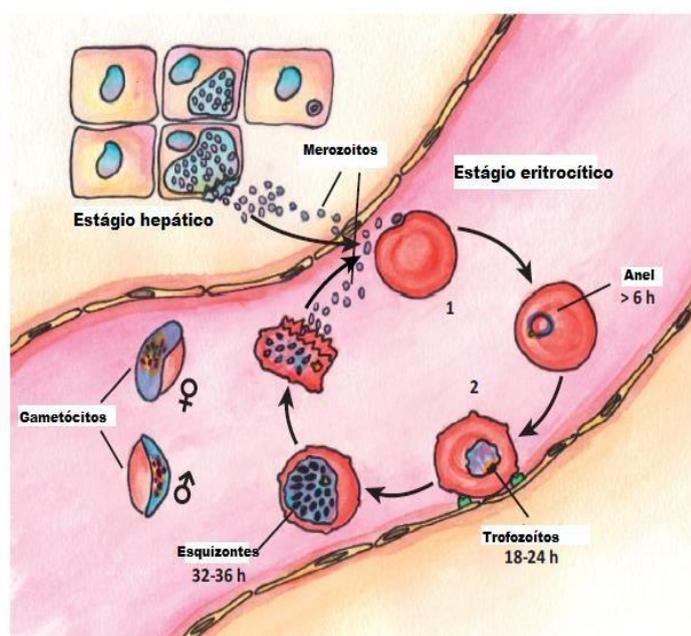


Figura 5: Liberação dos merozoítos hepáticos na corrente sanguínea e ciclo eritrocítico de *Plasmodium*.

Adaptado de KRISHNA et al. (2014).

Estudos recentes mostraram os esporozoítos são capazes de dessensibilizar as respostas inflamatórias das células de kupffer e ainda induzir processos de apoptose que favorecem a própria sobrevivência. Uma vez dentro das células, os parasitos ficam mais protegidos do ataque do sistema imunológico. Sua

permanência na célula hospedeira causa processos de destruição e induz o processo de morte celular, o que favorece a liberação dos parasitos para a continuidade do ciclo (KAKANI et al., 2016).

A fase hepática do ciclo biológico de *Plasmodium* apresenta-se como clinicamente silenciosa, pois raramente há manifestação de sintomas (MOTA e RODRIGUEZ, 2002).

As interações iniciais do merozoíto com a hemácia não são completamente compreendidas, mas sabe-se que envolve a sua aproximação ao eritrócito, com deformação da membrana da célula, orientação do parasito e sua penetração na célula e posterior reorganização da membrana plasmática (COWMAN et al., 2012).

O processo de interação entre os parasitos e as hemácias é possível pela presença de moléculas de superfícies que permitem a sua ligação. Entre elas esta a proteína EBA 175 (antígeno de ligação aos eritrócitos) de *P. falciparum* que se liga a glicoforina A, provocando alterações morfológicas no citoesqueleto da hemácia e que permite sua passagem para o meio intracelular (KOCH et al., 2017). Outro receptor seria a proteína Duffy, capaz de interagir com *P. vivax* (SINGH et al., 2006). A ausência dessa proteína em populações residentes na África impede a infecção por esta espécie, refletindo os baixos índices de malária vivax na região (DAYANANDA et al., 2018).]

Uma vez interiorizado, o parasito se desenvolve no vacúolo parasitóforo e continua sua maturação passando pelos estágios de trofozoíto, esquizonte, e merozoíto ocupando grande parte da célula. Por fim ocorre o rompimento e liberação na corrente sanguínea dos merozoítos que podem assim, invadir outros eritrócitos, reiniciando o ciclo sanguíneo (YAM e PRISER, 2017).

Uma pequena população de merozoítos se desenvolve em células denominadas gametócitos, que podem ser ingeridas pelo mosquito durante um novo repasto sanguíneo, e assim continuar seu desenvolvimento no inseto (figura 6), sem causar doença no mesmo (MILLER et al., 2002). Acredita-se que alguns mecanismos estão envolvidos no desenvolvimento dos gametócitos como a ativação do fator de transcrição específico AP2-G, em cepas de *P. falciparum*, elevando a expressão da PfAP2-G, sendo um regulador do estágio sexuado do parasito

(KAFSACK, 2014). Fatores internos como o microambiente, ou estresse por pressão do fármaco podem ajudar no processo de desenvolvimento de gametócitos (DYER e DAY, 2000).

Nas infecções causadas por *P. vivax* e *P. ovale*, durante o estágio hepático alguns parasitos permanecem em latência, ou seja, durante certo período não se desenvolvem em merozoítos, sendo chamados de hipnozoítos. Em algumas situações, estes deixam de ser dormentes e passam a dar continuidade ao ciclo eritrocítico, sendo então responsáveis pelos episódios de recaídas tardias da doença (KROTOSKI, 1985).

O crescimento e replicação do parasito nas hemácias causam prejuízos a estas, levando ao seu rompimento após a multiplicação dos parasitos e alterando sua forma, elevando a probabilidade de ocorrer um fenômeno de aderência que está diretamente relacionado às complicações observadas na infecção por *P. falciparum*, como ocorre na malária cerebral (PRUDÊNCIO et al., 2011). O fenômeno de sequestro também foi relatado para *P. vivax*, diretamente relacionado às formas graves e mortes associadas (KOCHAR et al.; 2009).

Para as diferentes espécies de parasitos, ocorre alteração na periodicidade da esquizogonia sanguínea, ou seja, a liberação dos parasitos das hemácias. Para *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. ovale* a liberação dos merozoítos ocorre em 48 horas e 72 horas para *P. malariae*. Estes intervalos coincidem com os picos febris da doença, porém esses padrões de periodicidade nem sempre são observados (ASHLEY et al., 2018).

Após a ingestão de sangue pelos mosquitos anofelinos (figura 6), os gametócitos migram para o estômago do vetor e ocorre o processo de fecundação e formação de um zigoto. Este se torna móvel, denominado oocineto que escapa da matrix peritrófica, e invade a parede do intestino médio, evoluindo a oocisto na porção externa do intestino médio. Em seguida ocorre a esporogonia resultando em centenas de esporozoítos que migram, por meio da hemolinfa, até as glândulas salivares do mosquito, onde ficam armazenadas para posteriormente serem inoculadas em um novo repasto sanguíneo (SULTAN et al., 1997).

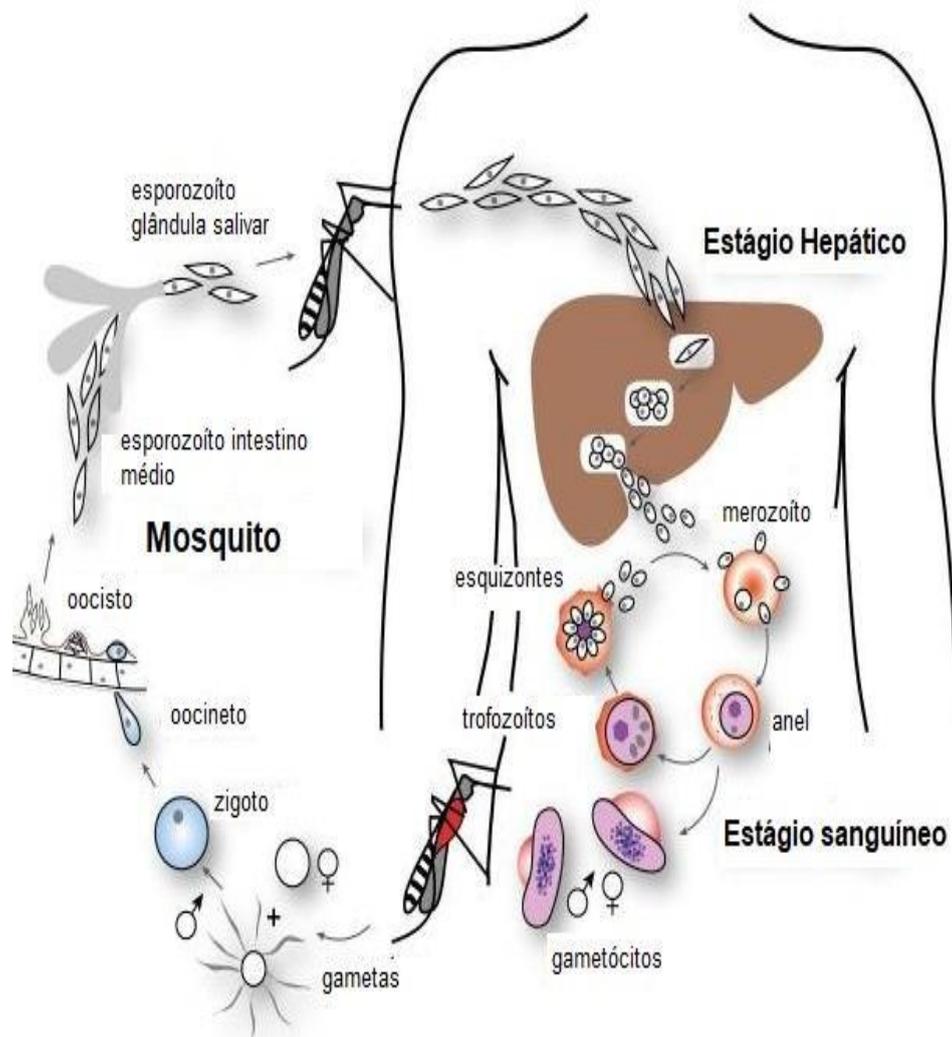


Figura 6: Ciclo biológico dos plasmódios no ser humano.
Adaptado de COWMAN et al.(2012).

1.4 ASPECTOS IMUNOPATOGÊNICOS RELACIONADOS AO PLASMÓDIO

A permanência dos esporozoítos na pele do hospedeiro vertebrado é transitória e não causa patologia. Após a entrada dos parasitos nas células hepáticas, ocorre um período de replicação intracelular que também é clinicamente silencioso. Em seguida, inicia-se o ciclo sanguíneo que é responsável pelas manifestações da doença (SCHOFIELD e GRAU, 2005). No momento do rompimento das hemácias, além dos parasitos, diversas substâncias são liberadas para o meio extracelular, tais como a GPI (glicosilfosfatidilinositol) e hemozoína, que estimulam uma resposta imunológica, e a liberação de citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral (TNF- α) e interleucina-1 (IL-1) por macrófagos. Ocorre o aparecimento de febre alta e calafrios, em um processo conhecido como acesso malárico (CLARK e SCHOFIELD, 2000).

O sistema imune inato tem grande importância no controle inicial da infecção, porém sua ativação exacerbada pode levar a fenômenos inflamatórios que agravam a doença. Nesse contexto os receptores do tipo Toll (TLR's – *toll like receptors*) presentes em células como macrófagos e células dendríticas, principalmente, sendo os principais Toll 2 e Toll 4, têm grande importância no reconhecimento dos antígenos parasitários, juntamente com os receptores NOD (*NOD like receptors*). Estes receptores ativados por regiões ou produtos do parasito, como a GPI, hemozoína e DNA, induzem cascatas de sinalização que culminam com a produção de citocinas e quimiocinas (KALANTARI, 2018).

Apesar das células imunes serem importantes para o controle da infecção, vários aspectos imunológicos são descritos e revelam uma resposta imune complexa. Como exemplo já foi descrita a subversão das células dendríticas que têm importante papel na ativação imunológica. Os monócitos com grande quantidade de hemozoína podem interferir no desenvolvimento destas células e assim contribuindo para a imunodepressão e, portanto, na desregulação do sistema imune observado na doença (SKOROKHOD et al., 2004).

Em relação à sintomatologia, os sinais clínicos podem aparecer entre o 7º e o 12º dias após a picada do vetor (PHILLIPS et al., 2017). Os eventos decorrentes

da malária vão depender de vários fatores, como a espécie do parasito e fatores inerentes ao hospedeiro como estado imunológico, nutricional e exposição prévia ao plasmódio. Nesse contexto, a doença tem sido classificada em: malária assintomática, não complicada e complicada (ou grave) (PHILLIPS et al., 2017; WASSMER, GRAU, 2017).

A malária não complicada é observada principalmente em adolescentes e adultos de regiões endêmicas e a malária complicada acomete crianças pequenas, indivíduos não imunes que viajam para áreas de alta transmissão, e gestantes primigestas (OUATTARA e LAURENS, 2014).

Os sintomas da malária não complicada são inespecíficos e incluem: febre com calafrios, dores musculares, dor de cabeça, icterícia. Na malária grave ou complicada ocorrem sintomas mais específicos como prostração, alterações respiratórias, sonolência, icterícia, convulsões, vômitos, choque (ASHLEY et al., 2018). O estabelecimento da infecção pode ocorrer uma vez que o parasito possui meios eficazes de evadir do sistema imune (YAM, PREISER, 2017).

A doença causada por *P. ovale* e *P. malariae*, *P. vivax*, pode ser mais branda, porém esta última espécie em casos mais graves pode causar morbidade e mortalidade (BAIRD, 2013). Durante a infecção por *P. falciparum*, as hemácias parasitadas apresentam mudanças na superfície com a exposição de proteínas na membrana formando protrusões (conhecidas como *Knobs*) que permitem que estas fiquem retidas em pequenos vasos, e dessa forma conseguem escapar do processo de filtração do sangue no baço. Isso é conhecido como fenômeno do sequestro de eritrócitos. Esse processo pode causar lesões nas células do endotélio vascular e obstrução, podendo trazer consequências sérias ao hospedeiro. É também chamado de citoaderência e é mediado pela proteína de membrana eritrocitária 1 (PfEMP1), presente na superfície da hemácia que se liga a proteínas do hospedeiro. As células infectadas podem também se ligar às células saudáveis, formando rosetas, favorecendo a obstrução vascular, gerando isquemia e hipóxia tecidual. As hemácias também podem se tornar rígidas, dificultando ainda mais o fluxo sanguíneo. O grau de lesão e as manifestações clínicas vão depender do órgão atingido (DONDORP et al., 2008; PHILLIPS et al., 2017; ASHLEY et al., 2018).

Pode ocorrer a malária cerebral, forma clínica cujo processo patogênico é complexo e parece envolver tanto aspectos mecânicos de citoaderência e formação de rosetas, quanto desequilíbrio na resposta inflamatória, na homeostase das células endoteliais e problemas quanto a integridade da barreira hematoencefálica. Porém, todos esses processos ainda são pouco compreendidos. A doença se manifesta com comprometimento da consciência, encefalopatia difusa e anormalidades na retina, gerando sintomas como cefaleia, convulsões, alterações de comportamento e pode ocorrer o coma (DUNST et al., 2017; WASSMER e GRAU, 2017).

O comprometimento dos rins é frequente em infecções ocasionadas por *P. falciparum* e *P. malariae*, mas existem relatos também para casos determinados por *P. vivax*. A disfunção neste órgão acontece principalmente devido a desordens hemodinâmicas e respostas imunológicas, o que está relacionado à deposição de imunocomplexos. A citoaderência e fenômenos embólicos podem levar a isquemia renal na infecção por *P. falciparum* (JUNIOR et al., 2017). Carvalho et al. (2010), descreveu o fenômeno de citoadesão de *P. vivax* em amostras de sangue coletadas em pacientes residentes da Amazônia brasileira, em menor grau do que para *P. falciparum*, mas contribuindo para o entendimento de novos processos relacionados com a malária vivax na sua forma mais grave.

O processo de aderência das hemácias infectadas, a liberação de citocinas e a adesão leucocitária podem lesar as células epiteliais, aumentando a permeabilidade dos capilares alveolares. Isso leva à perda de líquido intravascular para os pulmões, gerando lesão pulmonar aguda ou síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) (MOHAN et al., 2008).

Na gestante, o sequestro de eritrócitos parasitados pode causar a malária placentária que tem como consequências anemia materna, aumento do risco de aborto e baixo peso e morte fetal. O risco maior é para mulheres grávidas em regiões de baixa transmissão e primigestas, que normalmente não possuem anticorpos protetores (FRIED e DUFFY, 2017).

1.4.1 ALTERAÇÕES HEPATOESPLÊNICAS

O fígado é um órgão bastante estudado no contexto da malária por ser alvo do primeiro ciclo de reprodução do parasito, o que o torna objeto de interesse para novas terapias (RAHARDJO et al., 2013). Alterações hepáticas durante a malária são descritas (WILAIRATANA et al. 1994; VIRIYAVEJAKUL et al. 2014) e correlacionadas à mortalidade e morbidade nas infecções por *P. falciparum* (VIRIYAVEJAKUL et al., 2014), mais do que por *P. vivax* (ANAND e PURI, 2005).

Podem ocorrer variações nos níveis séricos de bilirrubina, aumentando a aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase, e, após farmacoterapia, os valores tendem a voltar à normalidade (WILAIRATANA et al., 1994). Manifestações clínicas como icterícia (devido aos depósitos de bilirrubina nos tecidos), podem mostrar algum grau de lesão hepática (VIRIYAVEJAKUL et al., 2014). Em regiões endêmicas, a icterícia ocorre em torno de 5,3% dos casos, porém em epidemias, pode apresentar variações entre 11,5 a 62%. Essa manifestação clínica parece ter origem multifatorial, relacionando hemólise intravascular, coagulação intravascular disseminada ou disfunção hepatocelular (ANAND e PURI, 2005). Pacientes com icterícia podem apresentar necrose, lesões granulomatosas, mudanças histopatológicas, congestão das células hepáticas, infiltrado inflamatório, deposição de hemozoína, e hiperplasia das células de Kupffer relacionados a processos de apoptose (ANAND e PURI, 2005, VIRIYAVEJAKUL et al., 2014).

O baço é um órgão com capacidade de filtrar de forma específica hemácias sanguíneas senis e as que apresentam algum tipo de alteração. Apresenta ainda outras funções como: indução de respostas imunes adaptativas, reciclagem de ferro pela quebra da hemoglobina, fagocitose de eritrócitos senis ou infectados, como ocorre na infecção por *Plasmodium*. Ele atua no desenvolvimento de respostas imunes contra malária, sobretudo em casos de reexposição. Em contrapartida, respostas inflamatórias não controladas no tecido e hiperplasia reticuloendotelial são observadas durante a infecção e podem levar a uma disfunção vascular grave e falência do órgão (DEL PORTILLO, 2012).

Morfologicamente, o baço é formado pela polpa branca, constituída de tecido linfóide que contém células responsáveis pelas respostas imunológicas (DEL PORTILLO, 2012). Ao redor da polpa branca encontra-se uma zona marginal, composta por macrófagos, linfócitos e células dendríticas, que são células responsáveis por vigiar de forma eficiente antígenos provenientes do sangue (FERRER et al., 2014). Encontra-se aí também a polpa vermelha, composta por uma malha reticular, onde ocorre a destruição de células vermelhas anormais (DEL PORTILLO, 2012).

Alterações como a esplenomegalia, embora se apresente de forma variada, é uma característica importante a ser observada na malária (FERRER et al., 2014) e já foi usada em estudos como um parâmetro para verificar a transmissão da doença em áreas endêmicas (CHAVES et al. 2011). Além do aumento da massa do órgão, outras questões podem ser observadas, como exemplo, mudança na distribuição dos leucócitos que, por sua vez, pode alterar o desenvolvimento das suas funções e impactar negativamente na capacidade de controlar a infecção (ACHTMAN et al., 2003).

O processo de anemia observado durante a malária, apesar de ser uma patogênese multifatorial, também pode estar relacionado à retenção pelo baço de hemácias infectadas por parasitos jovens, ainda na forma de anel (BUFFET et al. 2009) e hemólise de células não infectadas (MILLER et al., 2002).

1.5 IMUNIDADE E VACINAS

Em regiões endêmicas, parte dos indivíduos infectados podem se apresentar clinicamente imune, refletindo a capacidade do sistema imunológico adaptativo de conter a infecção. Porém esta é uma imunidade incompleta e se desenvolve em um período prolongado. Os indivíduos continuam apresentando parasitos no sangue, em baixo percentual, porém sem as manifestações clínicas típicas da doença (OUATTARA e LAURENS, 2014). Respostas humorais e celulares

estão presentes na tentativa de controlar o desenvolvimento da parasitemia (IRIEMENAM et al.; 2009). A imunidade clínica é pouco observada em áreas com menor transmissão como visto nas Américas (FERREIRA e CASTRO, 2016). Em indivíduos não expostos à malária, a sintomatologia clínica é mais frequente, e ainda podem ocorrer casos mais graves ou até mesmo a morte, o resultado da infecção pode variar conforme a idade, carga genética e experiência imunológica anterior à infecção (SCHOFIELD e GRAU, 2005; OUTTARA e LAURES, 2014).

Em regiões de elevada transmissão da malária, crianças com mais de seis meses de idade são particularmente susceptíveis, pois a maioria já não apresenta os anticorpos protetores da mãe (PHILLIPS et al., 2017). Essas, até os cinco anos, em média, são particularmente susceptíveis à forma grave da doença em regiões de elevada endemicidade, como observado na África, onde aproximadamente um quarto dos óbitos em crianças é devido à malária (MILLER et al., 2013). Nesses casos geralmente ocorre um típico quadro de acidose metabólica, malária cerebral e anemia grave (SCHOFIELD e GRAU, 2005).

Após os cinco anos, crianças e adultos que vivem nas áreas endêmicas desenvolvem uma imunidade clínica contra a infecção, que depende da contínua exposição ao parasito (PHILLIPS et al., 2017). Nas regiões de baixa transmissão, a infecção primária pode ocorrer em adultos, podendo levar a falha renal, edema pulmonar, choque e icterícia. A questão da dinâmica da transmissão é um fator importante no curso da doença, assim como a carga genética e resposta imunológica do hospedeiro (SCHOFIELD e GRAU, 2005).

Em regiões endêmicas, os pacientes podem apresentar sintomas da malária que não são específicos e inclui mal-estar, febre, fadiga, dores musculares, náuseas, vômitos. Muitos pacientes com a forma não complicada apresentam exame físico normal, enquanto outros podem ter anemia, febre e baço palpável. O fígado pode aumentar de tamanho, principalmente em crianças; em adultos é mais comum a icterícia. Em crianças que vivem em regiões onde a transmissão é estável, as infecções recorrentes levam a anemia, pela destruição dos eritrócitos e maior consumo de ferro pelo parasito, podendo evidenciar a esplenomegalia (WHITE et al., 2014).

Os aspectos imunológicos da malária têm sido estudados a fim de buscar alguma vacina anti-malária. Porém, em termos biológicos, os parasitos geneticamente são organismos de maior complexidade quando comparados a vírus e bactérias, sendo mais complicado o desenvolvimento desses produtos, pois apresentam um genoma variado e ainda apresentam um ciclo biológico complexo, o que pode explicar a dificuldade de se obter uma vacina eficaz (HOFFMAN et al., 2015).

O desenvolvimento de uma vacina antimalárica seria uma importante ferramenta de saúde pública para o controle da doença e evitaria as mortes e sequelas de indivíduos não imunes, como as crianças pequenas. As pesquisas visando o desenvolvimento de vacinas começaram por volta de 1930, utilizando parasitos mortos ou inativados que não provocaram repostas imunes eficazes (OUATTARA e LAURENS, 2015). Muito foi trabalhado nesse sentido e atualmente somente uma vacina, a RTS,S está licenciada (WILSON et al. 2019). As maiores dificuldades no desenvolvimento estão tanto na falta de compreensão de mecanismos imunológicos na doença quanto pela diversidade genética dos parasitos (OUATTARA e LAURENS, 2015).

Atualmente, a pesquisa de novas vacinas tem como foco o estudo da fase pré-eritrocítica, como a pesquisa de epítomos para proteínas circunsporozoíta (CS) e a proteína de adesão relacionada à trombospondina (TRAP) que se ligam aos receptores dos hepatócitos. Nesse caso, a mais avançada é a RTS, S/ASO1 que atua no estágio pré-eritrocítico do ciclo biológico dos plasmódios e apresenta em torno de 45% de proteção contra malária. Ela é constituída basicamente da proteína circunsporozoíta fundida ao antígeno de superfície do vírus da hepatite B (WILSON et al, 2019).

Outras vacinas estão em avaliação, como as que usam proteínas do parasito como a AMA-1 (antígeno de membrana apical-1), EBA175 (antígeno de ligação aos eritrócitos 175), MSP1 (Proteína de superfície da malária 3), RHS (proteína homóloga 5 de ligação aos retículos) entre outras de estágio eritrocítico. Existem também vacinas com o objetivo de bloquear a transmissão como Pfs25, 48, 45, 230, relacionadas às proteínas de superfície de *P. falciparum* 25, 48, 45, 230, respectivamente, e ainda vacinas relacionadas ao período gestacional, como a var2

CSA, que é uma variante de sulfato de condroitina relacionado ao processo de ligação do parasito à placenta (OUATTARA e LAURENS, 2015; WILSON, 2019).

As pesquisas hoje em dia buscam uma vacina licenciada que alcance pelo menos 75% de proteção contra *P. falciparum* e *P. vivax* nas regiões endêmicas. Para isso, estudos mais detalhados sobre os mecanismos imunológicos de proteção deverão ser conduzidos, bem como a avaliação dos riscos dessas vacinas (WILSON et al., 2019).

1.6 ESTRATÉGIAS DE CONTROLE DA MALÁRIA

Algumas medidas preventivas podem auxiliar na redução da doença, como o controle dos vetores através do uso de mosquiteiros (em portas e janelas) impregnados com inseticidas, estes atuam como barreira à entrada dos anofelinos nos domicílios; o uso de inseticidas, repelentes a base de DEET (N-N-dietilmetatoluamida) ou icaridina ou outros segundo recomendação médica. Orientar a população para evitar frequentar locais onde existem coleções hídricas como lagos e cachoeiras, no início da manhã e entardecer e usar roupas que visem proteger o corpo do vetor são também medidas preventivas importantes. Ações de políticas públicas devem ser realizadas no sentido de controlar os vetores; educação em saúde se mostra necessária (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

A quimioprofilaxia pode ser usada de forma limitada em áreas de alta e moderada transmissão na África, em grupos específicos como gestantes e crianças pequenas, com sulfadoxina-pirimetamina. Porém, deve se ter atenção especial ao desenvolvimento de formas resistentes dos parasitos (WHO 2018, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). No Brasil, os índices de malária são baixos e ocorre o predomínio de *P. vivax*. A eficácia da quimioprofilaxia nesse caso é baixa, assim esta não é indicada no país (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Como atualmente os medicamentos são as únicas formas de tratamento dos doentes, o desenvolvimento de novos fármacos, em virtude da ocorrência de

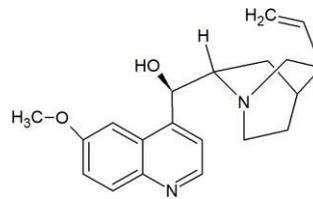
cepas resistentes é sempre necessário. O diagnóstico rápido também é essencial e é realizado por técnicas simples como a gota espessa e o esfregaço sanguíneo. Na técnica é coletada uma gota de sangue do paciente que é avaliada por microscopia ótica, buscando os parasitos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

1.7 QUIMIOTERAPIA ANTIMALÁRICA

O correto e rápido diagnóstico e tratamento oportuno são os meios mais objetivos de se conseguir eliminar a infecção, reduzindo a incidência de formas graves e a mortalidade (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). A quimioterapia antimalárica visa eliminar de forma rápida e completa o parasito no paciente acometido, evitando assim as complicações que podem advir com a falta do tratamento, como a anemia grave, complicações sistêmicas e malária cerebral no caso de *P. falciparum*. Outra importante ação da quimioterapia é interromper o ciclo de transmissão da doença evitando novos casos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

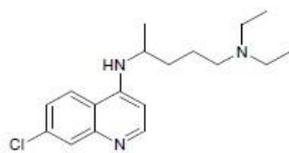
Observando o ciclo biológico dos plasmódios, algumas etapas importantes podem ser alvo para os quimioterápicos: a esquizogonia sanguínea, o surgimento de formas latentes hepáticas (os hipnozoítos) em *P. vivax* e *P. ovale* e a gametogênese. A conduta terapêutica deve levar em conta aspectos como: espécie do parasito, gravidez, idade, estado geral do paciente infectado. Atualmente, existem mais de dez classes de medicamentos antimaláricos (figura 7), porém a indicação correta depende do estado geral do cada paciente, bem como a espécie de plasmódio que o infecta (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

Quinina

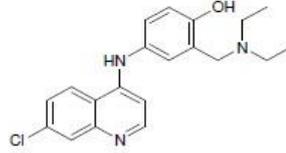


Fármacos derivados aminoquinolínicos

4-Aminoquinolinas

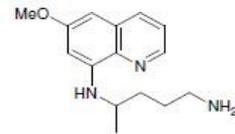


Cloroquina



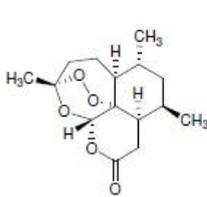
Amodiaquina

8-Aminoquinolinas

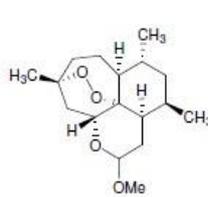


Primaquina

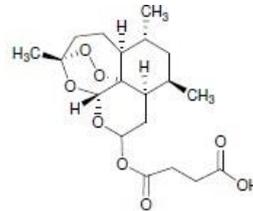
Artemisinina e seus derivados



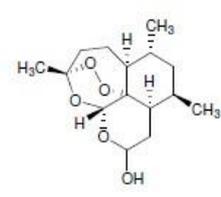
Artemisina



Arteméter

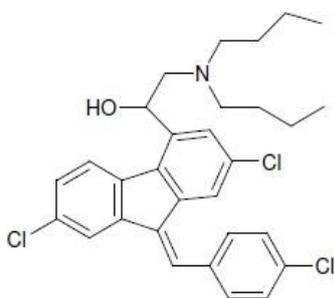


Artesunato

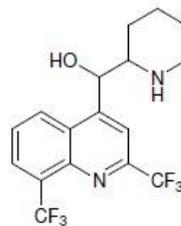


Dihidroartemisina

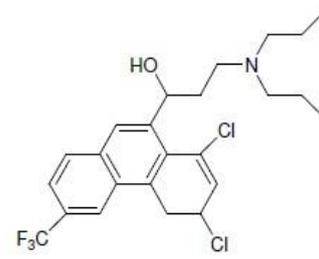
Outros fármacos antimaláricos



Lumefantrina



Mefloquina



Holofantrina

Figura 7: Medicamentos comumente usados para tratamento de malária.
Adaptado de CUNICO et al. (2008).

1.7.1 PRINCIPAIS ANTIMALÁRICOS

A maior parte dos fármacos utilizados na quimioterapia antimalárica atua sobre o estágio eritrocítico do parasito. Entre eles encontram-se a quinina, cloroquina, amodiaquina, mefloquina, sulfonamidas e derivados da artemisinina. Outro grupo destina-se ao tratamento das formas hepáticas do parasito; fazem parte dele a primaquina, inibidores da dihidrofolato redutase e proguanil (O'NEILL et al. 1998).

As aminoquinolinas fazem parte de um grupo de grande importância médica que englobam compostos como a amodiaquina e a cloroquina. Estes fármacos agem por inibição do metabolismo do grupamento heme da hemoglobina, impedindo a formação da hemozoína, causando danos às membranas das organelas e consequente morte do parasito (COMBRINCK et al., 2013).

A seguir serão apresentadas características importantes de alguns antimaláricos com destaque na quimioterapia.

1.7.1.1 QUININA

Na América do Sul, em meados do século XVII, padres Jesuítas observaram o uso de chás e bebidas preparadas por índios a partir de uma casca de árvore nativa do Peru, pertencente ao gênero *Chinchona*, utilizada para alívio da febre (ACHAN et al., 2011). Os cientistas franceses Pierre Pelletier e Joseph Caventou, em 1820, conseguiram extrair da casca desta árvore uma substância alcalóide denominada quinina. Após processo de purificação, essa substância foi usada para o tratamento da malária e começou a ser comercializada no mundo todo (MESHNICK et al., 2001). Em 1908, a estrutura química responsável pela ação antimalárica foi elucidada, revelando que o núcleo quinolínico era o potencial

componente antimalárico da quinina (STECK, 1972), permitindo então o estudo de novas drogas baseadas na atividade do anel quinolínico.

A quinina foi o principal tratamento contra esta infecção até a década de 1920, quando drogas mais efetivas ainda estavam sendo estudadas (ACHAN et al., 2011). Como este era o único tratamento contra malária na época, já havia a descrição de resistência e o primeiro caso reportado desse fenômeno no Brasil foi em 1910 (SÁ, 2011). Com o advento das guerras e a dificuldade de alguns países, como Alemanha e Estados Unidos de conseguirem o extrato bruto para obter a quinina, houve uma necessidade cada vez maior de se produzir novos fármacos para tratar a malária (CUNICO et al., 2008).

Quimicamente, a quinina é um alcaloide que tem o grupo arilaminoálcool e possui rápida ação esquizonticida contra o estágio eritrocítico do parasito. Age também contra gametócitos de *P. vivax* e *P. malariae*, mas não de *P. falciparum* (ACHAN et al., 2011). Sabe-se que este composto age no vacúolo digestivo, prejudicando o metabolismo do heme. Esta molécula pode reagir com os fosfolípidios de membrana causando a morte do parasito (FITCH e KANJANANGGULPAN, 1987).

A quinina possui baixo índice terapêutico, portanto, possui problemas relacionados a toxicidade e a ela são atribuídos diversos efeitos adversos como comprometimento da audição, zumbidos, dor de cabeça e náuseas. Em situações mais graves pode causar vertigem, vômitos, dores abdominais, diarreia, perda auditiva e distúrbios visuais, como a redução da visão (ACHAN et al. 2011). Esta substância tem sido recomendada, de forma alternativa, para o tratamento da malária em casos onde o artesunato não é aconselhável, no tratamento da malária grave e casos de mulheres no primeiro trimestre de gestação (ACHAN et al., 2011).

1.7.1.2 CLOROQUINA

A cloroquina (7-cloro-4-(4 dietilamina-1-metilbutilamino quinolina) pode ser considerada o agente quimioterápico mais importante da história (O'NEILL *et al.*, 1998). É um medicamento de baixa toxicidade e custo. É eficaz contra as formas sanguíneas do parasito, exceto gametócitos (PAYNE, 1987) e não atua sobre esporozoítos ou hipnozoítos hepáticos (O'NEILL *et al.*, 1998, PARHIZGAR e TAHHIGHI, 2017). A cloroquina é administrada por via oral e sua atividade antimalárica ocorre no vacúolo digestivo do plasmódio na forma eritrocítica, quando a mesma interfere na cristalização e detoxificação do heme liberado após a digestão da hemoglobina (GOLDBERG *et al.*, 1990).

A fórmula estrutural da cloroquina (figura 8) possui três partes principais: um anel aromático conjugado a um anel quinino e uma cadeia lateral. Na posição 7 encontra-se um átomo de cloro e na posição 4 uma amina. Devido a presença das aminas, a cloroquina tem um caráter alcalino, característica importante para seu mecanismo de ação (MUSHTAQUE e SHAHJAHAN, 2015).

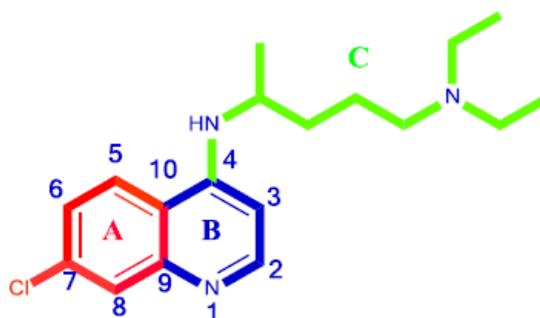


Figura 8: Estrutura química da cloroquina.

Adaptado de Mushtaque e Shahjahan (2015). A: anel aromático com cloro na posição 7. B: anel quinino, C: Cadeia lateral na posição 4.

No ciclo intra-eritrocítico o trofozoíto, para manutenção de seu metabolismo,ingere grande quantidade de hemoglobina do hospedeiro (cerca de 75 %) através de uma estrutura chamada cistótoma. As vesículas contendo hemoglobina são encaminhadas até o vacúolo digestivo do parasito. Os produtos da metabolização da

hemoglobina geram aminoácidos, que são utilizados para a maturação do parasito (GOLDBERG *et al.*, 1990), e também o grupamento heme (ferroprotoporfirina IX-Fe(II)PPIX), que é oxidado ferriprotoporfirina IX - Fe(III)PPIX e fica acumulado no vacúolo digestivo do protozoário (SHERMAN, 1977). A hidrólise da hemoglobina parece ser um processo cooperativo que requer cisteínas proteases (falcipainas) e proteases aspárticas (plasmepsinas) (BANERJEE *et al.*, 2002), mas os papéis específicos de diferentes enzimas neste processo são desconhecidos (SIJWALI; ROSENTHAL, 2004; FONG; WRIGHT, 2013)

Em um ambiente aquoso e lipídico, o heme livre (Fe(III)PPIX) é neutralizado pela formação de dímeros de hematina (β -hematina) por interações π - π , que se biocristalizam em um composto inerte que é a hemozoína (ZANG e HEMPELMANN, 1987; EGAN *et al.*, 2002, EGAN *et al.*, 2006, WUNDERLICH *et al.*, 2012). O heme livre pode também gerar radicais livres que são potencialmente tóxicos as células (VAN DER ZEE; *et al.*, 1996). O processo de biocristalização não é completamente compreendido, mas acredita-se que ocorre participação de certas proteínas e lipídeos (GORKA *et al.*, 2013). Compostos químicos que interferem nesta etapa da formação do cristal de hemozoína, como a cloroquina, tiveram um grande sucesso no combate a todos os plasmódios humanos por muitos anos (MILLER *et al.*, 2013).

A cloroquina (CQ) é uma base lipofílica fraca (pKa entre 8,1 a 10,2) e pode facilmente se difundir através da membrana do vacúolo. Devido ao pH baixo do mesmo (pH entre 5 e 5,2) se converte a CQ^{+2} , gerando espécies não solúveis e acumulando dentro do vacúolo. Este produto pode inibir o processo de biocristalização à medida que se desloca entre o cristal e a forma dímera do complexo de hematina (figura 9) (COMBRINCK *et al.*, 2013; EGAN e MARQUES, 1999; MUSHTAQUE e SHAHJAHAN, 2015; PARHIZGAR e TAHHIGHI, 2017).

Devido a passagem por difusão passiva da cloroquina para o vacúolo digestivo do parasito, esta pode promover a alcalinização do lúmen da organela, inibindo ou dificultando a digestão da hemoglobina por enzimas ali presentes, sendo outra forma de ação (WUNDERLICH *et al.*, 2012). Outro mecanismo de ação proposto para a cloroquina é a sua ligação à proteína LDH (lactato desidrogenase) do plasmódio (pLDH), pela inibição competitiva pelo sítio ativo do NAD (READ *et al.*, 1999). Quando isso ocorre, a ação da enzima é inibida e a sua função de participar

do processo glicolítico transformando de piruvato a lactato é interrompida, impedindo o processo de obtenção de energia para o parasito, provocando a sua morte (MENTING et al., 1997).

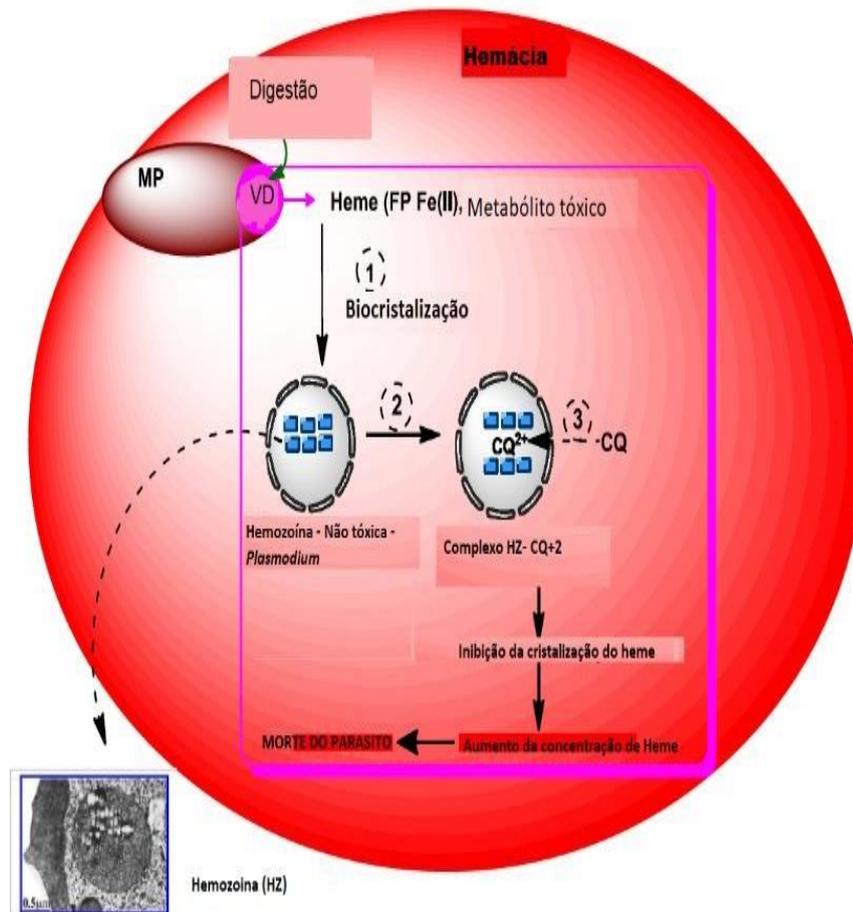


Figura 9: Mecanismo de ação da cloroquina.

Adaptado de Mushtaque e Shahjahan (2015). VD: Vacúolo digestivo, HZ: hemozoína.

(1) O grupo heme é tóxico ao parasito e sofre biocristalização até a formação da hemozoína. (2) A cloroquina permeia o vacúolo (3) e se desloca entre as forma dímera da hematina, inibindo o processo de biocristalização e formação da hemozoína (2).

Por volta da década de 1950, o uso da cloroquina se popularizou através das recomendações da OMS e, em conjunto com o uso do inseticida DDT, foi responsável pela eliminação da malária em diversas partes do mundo (FERREIRA e CASTRO, 2016). Porém, essa ampla utilização contribuiu para a resistência do *P. falciparum* (O'NEILL et al., 1998; WELLEMS; PLOWE, 2001). Após a extensa utilização da cloroquina, foram descritos os primeiros casos de resistência ao

fármaco na Colômbia, Venezuela, Tailândia e Camboja, relacionados à infecção por *P. falciparum* (PAYNE, 1987). Devido ao aumento desse fenômeno, a OMS orientou o fim da utilização da cloroquina pra tratamento da infecção causada por *P. falciparum* (BURGESS et al., 2010), e como alternativa foi preconizado o uso da terapia combinada com a artemisinina (ACT) e seus derivados.

A respeito do fenômeno de resistência a cloroquina foi verificado uma associação com a presença de mutações em proteínas do vacúolo digestivo, diminuindo a concentração do fármaco e o acesso ao heme (CARLTON et al., 2001). *P. falciparum* é capaz de regular os genes e dar origem a cepas resistentes aos antimaláricos (HU et al., 2017). Um exemplo disso é a codificação da proteína transmembrana de *P. falciparum* denominada PfCRT (molécula transportadora de resistência à cloroquina), que é expressa na membrana do vacúolo digestivo e está relacionada a alterações no fluxo da droga ou redução da sua ligação. Através dela a cloroquina é transportada para fora do vacúolo digestivo impedindo que o mesmo alcance níveis tóxicos para o parasito (FIDOCK et al., 2000; MILLER et al., 2013).

Outro gene envolvido é o *pfmdr1* (proteína 1 de resistência a múltiplos fármacos) que codifica uma glicoproteína transmembrana, a Pgh1 (homólogo 1 da glicoproteína P), que tem sido relacionada a fenômenos de resistência a múltiplas drogas para tratamento de tumores e também malária (PRICE et al., 1999). Estas proteínas expõem os fármacos para o fora do vacúolo digestivo parasitário (COWMAN, 1991). Acredita-se que as mutações em *pfmdr1* possam aumentar o grau de resistência a cloroquina, embora uma resistência completa não seja observada (BABIKER et al, 2001).

O relato da resistência à cloroquina no tratamento de infecções por *P. falciparum* é amplamente difundido, porém esse fenômeno já foi observado também em cepas de *P. vivax*, com o primeiro caso descrito em 1989 (RIECKMANN et al., 1989). Esses casos ocorrem em alguns países, inclusive nas Américas (HOWES et al., 2016). No Brasil, foi descrito caso de resistência a essa terapia, bem como no tratamento com mefloquina, na Amazônia Brasileira em 1999 (ALECRIM et al., 1999). Apesar de a cloroquina exercer ações semelhantes em *P. vivax* e *P. falciparum*, os mecanismos de resistência não são necessariamente os mesmos. Podem estar relacionados a diferentes eventos evolutivos, com diferentes classes de polimorfismos genéticos entre essas espécies (CARLTON et al., 2001).

1.7.1.3 OUTROS DERIVADOS AMINOQUINOLÍNICOS

a) Amodiaquina

Baseado nos bons resultados obtidos pela síntese da cloroquina novos análogos foram sintetizados, entre eles a amodiaquina (AQ). Esse é um fármaco de boa eficácia e foi usado como medicamento alternativo a cloroquina. Embora tenha benefícios, apresenta restrições devido a problemas de toxicidade hepática e hematológica. Atualmente seu uso é limitado devido aos problemas de resistência dos parasitos à cloroquina e aparecimento de resistência cruzada (PARHIZGAR e TAHGHIGHI, 2017).

A AQ é uma base de Mannich 4-aminoquinolina e possui mecanismo de ação parecido com o da cloroquina. Foi usada anos atrás como profilaxia e hoje é usada na terapia combinada a artemisinina para tratamento da malária não complicada (GORKA et al., 2013, PARHIZGAR e TAHGHIGHI, 2017).

b) Mefloquina

A mefloquina é um medicamento que foi desenvolvido em pesquisas americanas, durante a década de 60. É um composto estruturalmente relacionado à quinina, sendo um 4-quinolinometanol fluorado (SCHLAGENHAUF e KAIN, 2013). Atua como esquizonticida sanguíneo contra *P. falciparum* e *P. vivax* e não age sobre gametócitos. É um medicamento com elevada capacidade de ligação às proteínas plasmáticas e possui longo tempo de meia vida (entre 10 a 40 dias) (FUNASA, 2001). Os principais efeitos adversos relacionados ao uso da mefloquina são dores de cabeça, tonturas, vômitos, sonhos anormais, humor deprimido, e ainda ocorre

relatos que pode levar ao surgimento de manifestações neuropsiquiátricas importantes, como psicose e suicídio (FUNASA, 2001, TICKELL-PAINTER et al., 2017).

Atualmente o uso da mefloquina é recomendado em combinação com o artesunato na ACT (WONG et al., 2017) ou como profilaxia da malária em áreas onde ocorrem cepas resistente à CQ; porém, por apresentar toxicidade seu uso é restrito (PARHIZGAR e TAHGHIGHI,2017). O mecanismo de ação não está claro, mas acredita-se que ela pode ser inibidora da síntese proteica (WONG et al., 2017) e ainda pode interferir na formação da hemozoína (FOLLEY e TILLEY, 1997; FONG e WRIGHT, 2013).

1.7.1.4 8-AMINOQUINOLINAS: PRIMAQUINA E TAFENOQUINA

A primaquina é um composto ativo para as formas hepáticas do parasito, como esquizontes e hipnozoítos em infecções por *P. vivax*. Pertence a classe química das 8-aminoquinolinas e pode ser usada preventivamente ou para tratamento radical da doença. Parece atuar nas mitocôndrias interferindo processo de respiração do plasmódio ou ainda podendo ser capaz de gerar radicais livres nocivos ao parasito (HILL et al., 2006).

Apesar de ser um fármaco antimalárico eficaz, pode ser perigosa para indivíduos deficientes de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), levando como efeito adverso um quadro de anemia hemolítica dependente da dose utilizada (RAMOS JUNIOR et al., 2010). A enzima está relacionada ao equilíbrio de oxidação-redução das hemácias e a deficiência é um distúrbio relacionado ao cromossomo X, comum em residentes de áreas tropicais e subtropicais. Nesses casos a realização de testes que verificam a deficiência é necessária (BANCONE et al., 2019;, HOWES et al., 2012). A eficácia do tratamento com primaquina é dependente da combinação de um esquizonticida sanguíneo, como é realizado na terapia combinada proposta pelo OMS (FERNANDO et al. 2011).

Recentemente a tafenoquina, uma 8-aminoquinolina derivada da primaquina foi aprovada nos Estados Unidos para ser usada profilaticamente. Apresenta meia-vida de 17 dias, o que permite ser usada semanalmente. Não é recomendada para pacientes com psicose pré-existente, deficientes em G6PD e gestantes (BERMAN, 2019).

1.7.1.5 ARTEMISININA E SEUS DERIVADOS

Durante a década de 1970, pesquisadores chineses, baseados em conhecimentos populares sobre o tratamento da febre, isolaram da planta *Artemisia annua* uma substância química, a artemisinina, com potencial atividade antimalárica. (KLAYMAN, 1983, PACKARD, 2014).

A partir da artemisinina foram obtidos derivados sintéticos mais solúveis como o artesunato, arteméter e dihidroartemisinina (DHA), todos pertencentes ao grupo químico das lactonas sesquiterpênicas. Alguns mecanismos de ação têm sido atribuídos à artemisinina entre eles estão descritos: a sua interação com heme liberado pelo metabolismo do parasito que cliva a ligação endoperóxido e forma radicais livres que podem destruir diversas membranas, levando o parasito a morte (MESHNICK et al., 1996). As espécies altamente reativas também são capazes de reagir por alquilação com a hematina, inibindo o processo de formação do cristal (LOUP et al., 2007).

Outro importante mecanismo de ação atribuído a Artemisinina e seus derivados seria sua ação destruidora de proteínas e a inibição de proteossomas, que levaria ao acúmulo de proteínas danificadas e ubiquitinadas, e consequente morte do parasito (BRIDGFORD et al., 2018). A artemisinina é capaz ainda de atuar sobre proteínas importantes como a PfATP6, inibindo-a e prejudicando o transporte e controle dos níveis de cálcio do parasito, mecanismo não compartilhado por outros fármacos (O'NEILL et al., 2010).

Os derivados da artemisinina são os fármacos mais potentes contra todos os estágios eritrocíticos do parasito e ainda sobre os gametócitos (WHITE, 2008). Alguns derivados como arteméter, artemotil (arteether) ou artesunato, após administração oral ou parenteral, são convertidos em dihidroartemisinina *in vivo*, e tem tempo de meia vida curto na corrente sanguínea, cerca de uma hora (WHITE, 2008).

A terapia combinada com a artemisinina (ACT) é uma recomendação para o tratamento da malária não complicada relacionada à *P. falciparum*, com o objetivo de evitar o aparecimento de cepas resistentes (PACKARD, 2014). Na combinação é usado algum derivado da artemisinina com outros fármacos disponíveis como a lumefantrina, mefloquina, entre outros. E a escolha desses fármacos deve ser baseada em resultados de eficácia relacionada às cepas locais (WHO, 2018).

Casos de resistência a ACT já foram observados na província de Pailin, no Camboja (AMARATUNGA et al., 2016), na República Democrática Popular do Lao, Mianmar, Tailândia e Vietnã (WHO, 2017). Com esse cenário, esforços intensos têm sido realizados por grupos de pesquisa para realizar estudos que visam conter o problema, principalmente devido à falta de um antimalárico eficaz para o tratamento quando existe falha da artemisinina e da terapia combinada (O'BRIEN et al., 2011; MILLER et al., 2013).

Conforme diretrizes do Ministério da Saúde, no Brasil atualmente os esquemas terapêuticos são: **(1)** para tratar a malária não complicada por *P. vivax* é recomendado o uso da cloroquina por 3 dias combinada com primaquina por 7 dias, caracterizando o tratamento curto, ou ainda pode ser feito o tratamento longo com 3 dias com cloroquina e 14 dias com primaquina; **(2)** nas infecções ocasionadas por *P. falciparum* utiliza-se a ACT, com arteméter e lumefantrina ou artesunato e mefloquina, para tratamento contra as formas eritrocíticas e primaquina para eliminação dos gametócitos, por 3 dias; **(3)** nas infecções por *P. malariae*, a cloroquina é usada por 3 dias; **(4)** para tratamento da malária não complicada por *P. falciparum* em gestantes é indicado o tratamento com quinina e clindamicina e a partir do segundo trimestre de gestação é permitido o uso de ACT. A primaquina e ACT são contraindicados nos três primeiros meses de gestação e crianças menores de seis meses de idade (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

1.8 MALÁRIA E DESENVOLVIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS

1.8.1 AVALIAÇÃO *IN SILICO* DE NOVOS CANDIDATOS À FÁRMACOS

1.8.1.1 PROPRIEDADES FARMACOCINÉTICAS DE NOVOS CANDIDATOS À FÁRMACOS

As etapas que fazem parte do desenvolvimento de novos fármacos são de extrema complexidade, envolvendo pesquisa, conhecimentos, gasto econômico e tempo. Este momento envolve questionamentos éticos e, devido a isso, os estudos iniciais são realizados em sistemas *in vitro* e em animais de laboratório na fase pré-clínica, para depois ser realizada em humanos, na fase clínica (LIN, 1998).

Com o propósito de reduzir o custo e o tempo demandando ao estudar uma gama de compostos, as empresas farmacêuticas têm adotado modelos computacionais que ajudam a prever se os novos candidatos têm possibilidades reais de se tornar um fármaco e, assim, depois dos dados preditivos, poderá dar continuidade ou não aos clássicos testes *in vitro* e *in vivo* na fase pré-clínica (MODA, 2011). Atualmente, encontram-se disponíveis na internet algumas plataformas que ajudam a prever propriedades desses candidatos, quanto a aspectos físico-químicos e farmacocinéticos (CHENG et al., 2012; MABKHOT et al., 2016).

Os estudos de farmacodinâmica que avaliam a interação do candidato com seu alvo de ação são de extrema importância, porém aspectos farmacocinéticos também devem ser levados em consideração. A farmacocinética é o estudo do tempo de absorção (A), distribuição (D), metabolização (M) e excreção (E) de um composto. Este estudo é conhecido como propriedades ADME e é crucial para que determinado fármaco atinja o local de ação em termos de concentração e tempo adequados, além da eliminação, sem causar efeitos tóxicos ao paciente.

Além disso, o fármaco deve possuir boa atividade farmacológica, tanto em relação à potência, quanto à atividade (FAN e LANOY, 2014; MODA, 2011; LIN, 2003).

Muitos compostos que apresentam elevada potência em estudos *in vitro* podem ter baixa eficácia *in vivo*, ou ainda podem ser tóxicos. Isto pode ser atribuído a problemas relacionados à farmacocinética da substância, que pode ter dificuldades no processo de absorção ou reduzido tempo de meia vida. Pode ocorrer toxicidade devido à própria constituição da molécula ou ainda em decorrência de algum tipo de interação, gerando metabólitos reativos que causam danos às células (LIN et al., 2003).

Quando um fármaco é administrado, passa pela primeira etapa que é a absorção, que é o processo em que ele sai do local de administração e chega à corrente sanguínea. Quando a administração é feita pela via oral, que é a via mais aceita pelos pacientes, a forma farmacêutica precisa passar pelo processo de desintegração (no caso de forma farmacêutica sólida), dissolução, solubilização e, por fim, a absorção no estômago ou intestino humano. Este processo pode ocorrer de forma passiva, ou ativa, ou seja, com gasto energético. Muitos compostos em potencial não conseguem ser efetivos *in vivo* devido à baixa absorção pela via oral (LIN et al., 2003; MODA, 2011).

A difusão passiva é o mecanismo mais comum de passagem dos fármacos pelo trato gastrointestinal. Estimativas simples de propriedades físico-químicas como o log P (coeficiente de partição), ligação de hidrogênio, tamanho da molécula e solubilidade podem ajudar a entender o comportamento dos mesmos (LIPINSKI, 1997).

A lipofilicidade define a afinidade da substância em estudo com um substrato lipídico e pode ser avaliada pelo cálculo do log P, que mensura a sua distribuição em um ambiente de um sistema bifásico (n-octanol e água) através de uma membrana artificial. Compostos que apresentam essa grandeza superior a cinco, geralmente apresentam limitações de solubilidade e são pouco absorvidos (YANG et al., 1997). Valores de P negativos estão relacionados à hidrofiliabilidade e a baixa absorção, uma vez que apresentam dificuldades de ultrapassar as barreiras lipídicas (LIN et al., 2003). Fármacos de baixa solubilidade podem ser altamente lipofílicos e, assim, terem dificuldades de ser absorvidos; fármacos muito hidrofílicos

podem facilmente ser dissolvidos, mas apresentam dificuldades de absorção (ALQAHTANI, 2017).

As ligações de hidrogênio também podem influenciar a absorção (LIPINSKI, 1997). Moléculas que possuem boa solubilidade possuem menos que cinco grupos doadores de ligação de hidrogênio, como OH e NH e no máximo dez grupos aceptores de ligações de hidrogênio como a soma de N e O, que é uma medida aproximada de ligações de hidrogênio (LIPINSKI et al., 1997).

Após o processo de absorção, ocorre a distribuição através da circulação sanguínea do fármaco até o meio extravascular (LIN et al., 2003). Em relação a esta etapa, um importante ponto que deve ser observado é a ligação dos fármacos a proteínas plasmáticas, que de forma indireta pode afetar o resultado do efeito farmacológico. As principais proteínas envolvidas são a albumina e a α -glicoproteína ácida. (LU, 1998). A ligação a estas ocorre de maneira reversível, portanto, à medida que fármacos não ligados chegam a circulação, ocorre novamente a dissociação e uma nova ligação é formada. Esse processo retarda a chegada dos fármacos ao local de ação, principalmente quando a maioria das moléculas está ligada. Em contrapartida, fármacos que possuem baixa ligação às proteínas plasmáticas, chegam rapidamente em elevada concentração ao seu local de ação (MODA, 2011).

Outro importante ponto a ser discutido dentro da farmacocinética é a capacidade de penetração de substâncias na região encefálica, pois a barreira hematoencefálica (BHE) pode dificultar a entrada no sistema nervoso central. A BHE é uma microvasculatura semi-permeável formada por várias células, sobretudo células endoteliais extremamente unidas (DANEMAM e PRAT, 2015), que têm o propósito de proteger a região de toxinas e seus efeitos nocivos.

A BHE é um importante mecanismo de defesa do organismo, porém também pode dificultar a passagem de fármacos que têm finalidade de tratar enfermidades na região. Nesse caso, estas substâncias necessitam ter propriedades que permitem a passagem pela barreira (PATEL e PATEL, 2017). Em contrapartida, fármacos cujo objetivo não seja o tratamento de enfermidades do SNC, e que consigam adentrar a BHE, não são interessantes uma vez que podem gerar efeitos indesejáveis na região (MODA, 2011).

Outra etapa importante é o processo de metabolismo ou biotransformação dos fármacos. Nesta, ocorre um fenômeno químico de alteração do composto original de forma que ele possa ser eliminado do organismo. O principal órgão responsável pela metabolização de fármacos é o fígado, mas este processo pode ocorrer em menor grau nos pulmões, intestino e rins (LIN et al., 2003).

Nos hepatócitos, está presente um conjunto de enzimas que forma o citocromo P450 (CYP450), que são essenciais ao metabolismo de xenobióticos (substâncias estranhas ao organismo humano). A expressão de cada uma das CYP'S é regulada por diversos fatores como xenobióticos, polimorfismos genéticos, regulação por citocinas, hormônios, alterações patológicas, sexo, idade entre outros (ZANGER e SCHWAB, 2013).

O metabolismo tem como objetivo mudar a estrutura de xenobióticos como os fármacos, por exemplo, de modo a torná-los mais hidrofílicos. Para isso ocorrer, existem reações metabólicas que podem ser categorizadas em duas fases. A primeira denominada de fase I ocorre pela metabolização pelas enzimas do citocromo P450, que promovem reações de oxidação, redução, hidroxilação e hidrólise, de modo a obter um composto mais solúvel e que terá mais facilidade de ser eliminado. A fase II consiste em reações químicas de conjugação, onde substâncias polares são associadas covalentemente ao substrato e assim pode ser eliminado na urina (LIN, 2003).

A CYP450 é uma família composta por diversas enzimas, sendo as principais: CYP1A2, CYP2C9, CYP2C18, CYP2C19, CYP2D6, CYP 2E1 e CYP3A4, que são responsáveis por metabolizar 90% dos fármacos (BIBI, 2008; MODA, 2011; EL-SHERBENI e EL-KADI, 2016).

Após a administração de compostos químicos, poderá ocorrer uma interação com as enzimas do CYP e assim afetar a administração de outras drogas. A maneira mais comum observada de interação é como inibidor, mas os compostos podem atuar também como indutores ou substratos. O conhecimento sobre esses processos é importante para avaliar o tratamento onde existe mais de uma droga e os efeitos que podem ser provocados. Quando existe um inibidor, poderá ocorrer um aumento da concentração do substrato e isso pode ocorrer de maneira reversível ou irreversível (BIBI, 2008).

Os compostos podem atuar ainda como substratos, e, portanto, susceptíveis a oxidação, hidroxilação, redução e hidrólise, e, assim são excretados facilmente. Podem ainda ser indutores, estimulando a aceleração do processo de metabolização e excreção dos fármacos. De forma geral, o estudo dessas interações entre as drogas e as proteínas envolvidas no processo de metabolização é de grande importância, uma vez que certas interações podem levar a efeitos adversos graves, que inclusive pode culminar com a morte de pacientes (BIBI, 2008). Além dessas interações, o produto final da metabolização poderá ter ou não atividade. Quando esta ocorre, o produto inicial é considerado um pró-fármaco ou pró-droga (MODA, 2011).

O conceito de biodisponibilidade no contexto da farmacocinética e farmacodinâmica é de extrema importância, pois representa a grandeza que avalia a fração percentual do fármaco que é capaz de alcançar a circulação sanguínea de forma inalterada, após ser administrado e assim alcançar o sítio de ação. A biodisponibilidade de um fármaco depende de diversos fatores como a dissolução e solubilidade (ALQAHTANI, 2017).

Além das propriedades ADME, os compostos, durante o seu desenvolvimento, também deverão ser avaliados quanto às questões toxicológicas (T), de modo a avaliar a segurança dos compostos candidatos. São avaliados parâmetros de carcinogenicidade, mutagenicidade, genotoxicidade e toxicidade aguda.

Uma substância carcinogênica é capaz de produzir câncer no organismo. O termo mutagenicidade indica a propriedade que uma substância tem de produzir danos genéticos, por alterações no DNA (ácido desoxirribonucleico), que podem ser transmitidos. São exemplos de mutagenicidade: mutações genéticas, aberrações cromossômicas, alterações no número de cromossomos (BENIGNI e BOSSA, 2011).

A genotoxicidade é um termo mais abrangente, porque além dos efeitos mutagênicos, ela pode gerar efeitos no DNA não transmissíveis às células-filhas. Um tipo de teste *in vitro* utilizado para avaliar a genotoxicidade é o teste de AMES, onde são utilizadas bactérias *Salmonella typhimurium* geneticamente modificadas, que são sensíveis a diversas substâncias capazes de gerar lesões ao DNA. No ensaio, as mutações são percebidas quando o composto é adicionado em cultura e as

mutações reversas permitem que as bactérias sintetizem histidina e consigam crescer em meio com ausência desse aminoácido, indicando que o composto foi capaz de interagir com o DNA (PEDREIRO, 2016).

Nas últimas décadas, modelos de relações de estrutura-atividade quantitativas (*quantitative structure-activity- QSAR*) têm sido usados para prever a toxicidade aguda em roedores a agentes orgânicos. Estes estudos utilizam métodos estatísticos para avaliar a toxicidade aguda, porém utiliza um número pequeno de compostos, o que limita o valor preditivo (LI et al., 2014).

Como uma forma de avaliação preventiva, a Agência de Proteção Ambiental americana (EPA U.S., do inglês: *Environmental Protection Agency*) determinou quatro categorias de toxicidade com base na dose letal média (LD_{50}). As categorias variam de I a IV, sendo que a I é de produtos perigosos IV, é considerada praticamente atóxica (EPA, 2012).

Tabela 1: Valores de concentração para análise de toxicidade aguda oral. Adaptado de: LABEL REVIEW MANUAL, U.S.EPA.

Tabela de toxicidade oral aguda			
Categoria I	Categoria II	Categoria III	Categoria IV
$LD_{50} \leq 50 \text{ mg/kg}$	$LD_{50} > 50-500 \text{ mg/kg}$	$LD_{50} > 500-5000 \text{ mg/kg}$	$LD_{50} > 5000 \text{ mg/kg}$

As análises *in silico*, de modo geral, podem ajudar a prever os parâmetros ADMET (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade), bem como a toxicidade oral aguda de um composto, fornecendo informações importantes no processo de triagem de novos fármacos (CHENG et al., 2012). Estes estudos têm mostrado grande relevância, uma vez que fornecem diversificados resultados, baseados em análises estatísticas, que podem prever o comportamento de determinada molécula e são de baixo custo. Dessa forma, é possível analisar centenas de compostos e eliminar estruturas químicas que não tiveram resultados satisfatórios nos testes preliminares (GLEESON, et al., 2011; WADOOD et al., 2013).

1.8.1.2 MODELOS DE *DOCKING* MOLECULAR

Outra ferramenta utilizada na triagem de novos fármacos é o *docking* molecular, que ajuda a prever como seria o comportamento de uma molécula em um sítio alvo. Durante o processo computacional ocorrem duas etapas, a primeira é a verificação da orientação da molécula substituinte no sítio e a segunda avalia a afinidade dessa ligação (MENG et al., 2011). No contexto da quimioterapia antimalárica, esta abordagem computacional também vem sendo usada para prever possíveis alvos de ação de candidatos a fármacos em proteínas do parasito (GRANCHI et al. 2010; PENNA-COUTINHO et al., 2011; CORTOPASSI et al. 2011).

Uma enzima bastante estudada é a lactato desidrogenase de *P. falciparum*, que está envolvida no processo de obtenção de energia do parasito pela via glicolítica. Ela participa da conversão de piruvato em lactato e vice-versa. No processo de conversão do piruvato, o NADPH funciona como cofator, e depois é convertido em NAD⁺. Como esta enzima tem aspectos bem diferentes da lactato desidrogenase humana, ela tem sido alvo de pesquisa para quimioterapia antimalárica (GRANCHI et al., 2010, PARTHIBAN et al., 2015). Estudos mostram que a cloroquina é capaz de interagir com a pLDH através da inibição competitiva da ligação do NADH no sítio ativo (READ et al. 1999).

Assim, vários trabalhos que avaliam compostos que possuem o anel-quinolínico em sua estrutura têm utilizado o *docking* molecular na tentativa de buscar um possível mecanismo de ação dos compostos (PENNA-COUTINHO, 2011, CORTOPASSI et al., 2011; PARTHIBAN et al., 2015).

1.8.2 OBTENÇÃO DE NOVOS COMPOSTOS SINTÉTICOS POR TÉCNICAS DE HIBRIDIZAÇÃO MOLECULAR

Com o avançar do conhecimento sobre resistência aos medicamentos, foi recomendado pelos órgãos de saúde à combinação das quinolinas com outros antimaláricos, como é observado hoje no uso da terapia combinada com a artemisinina (ACT). Embora os resultados sejam positivos com essas combinações, existem relatos atuais de cepas resistentes a esta nova terapia, o que gera grande preocupação (WHO, 2014). Outro fator negativo do uso de terapias combinadas é o possível aparecimento de interações medicamentosas, o que pode limitar esse tipo de terapêutica (NQORO et al., 2017). Em virtude dessas constatações, o desenvolvimento de novos fármacos tornou-se uma necessidade ainda maior e as pesquisas têm sido conduzidas na busca de novas terapias (MUSHTAQUE e SHAHJAHAN, 2015).

Com o fenômeno de resistência à cloroquina, alguns pesquisadores poderiam questionar a validade de continuar os estudos com os derivados 4-aminoquinolínicos, mas trabalhos mostram que esse grupo químico ainda pode ser explorado. Para corroborar isso, pesquisas que avaliaram diversas cepas, mostraram que, nem sempre é observável o fenômeno de resistência cruzada, ou seja, o fato de uma cepa ser resistente a cloroquina, não a faz necessariamente resistente a outros derivados similares (O'NEILL et al., 1998). Por exemplo, cepas de *P. falciparum* podem ser resistentes à cloroquina, mas se mostram sensível a amodiaquina ou outros compostos relacionados. Algumas modificações estruturais no núcleo quinolínico podem manter a atividade sem causar resistência, sendo assim viável o estudo de novos derivados (O'NEILL et al., 1998).

O elevado custo para o desenvolvimento de novos compostos para o tratamento de diversas doenças desperta o interesse de laboratórios em investir em técnicas de hibridização molecular, que têm como objetivo manter as características farmacofóricas dos compostos originais em um novo composto (MEUNIER, 2008). As moléculas obtidas por esta técnica, do ponto de vista terapêutico, podem ser mais interessantes, sobretudo em relação a custo-benefício e redução das

interações medicamentosas observadas em terapias que utilizam diversos medicamentos. Outra vantagem seria que composto híbrido é distribuído, metabolizado e excretado apenas uma vez, e não ocorre o processo de competição por proteínas plasmáticas, como acontece com na politerapia (LODIGE e HIERSH, 2015; NQORO et al., 2017).

Segundo Gasco e colaboradores (2008), a técnica de hibridização tem como vantagens além do menor custo, boa aceitação dos pacientes e perfil farmacocinético mais previsível.

Na malária, existem vários trabalhos abordando o estudo de híbridos (SALAHUDDIN et al., 2013, MANOHAR et al., 2014, HU et al.; 2017, MAURYA et al. 2017). Muitos mostraram que alterações na cadeia lateral da amina podem gerar atividade em cepas *P.falciparum* resistentes. Mas alterações no núcleo quinolínico podem não ser interessantes, uma vez que podem alterar o pKa (constante de dissociação) da molécula e assim influenciar em alterações de parâmetros físico-químicos, por exemplo. Modificações no núcleo não têm sido relacionadas com a atividade em cepas resistentes e o foco dos estudos são as alterações na cadeia lateral do composto (HU et al. 2017, MADRID et al., 2005).

Alguns fármacos antimaláricos ainda em fases de estudo foram obtidos por meio desse processo. A ferroquina, que é um dos fármacos mais estudados atualmente, encontra-se em estudo de fase clínica IIB (HU et al., 2017). Esta é eficaz contra *P. falciparum* resistente a múltiplas drogas, principalmente quando comparado com a cloroquina, quinina, mefloquina e piperquina, mas não com o artesunato (BARENDS et al., 2007).

Outro fator negativo relacionado a esse fármaco é a capacidade de provocar danos ao fígado, como ocorre com a amodiaquina e, a capacidade de promover alterações na repolarização cardíaca, relacionada ao aumento do intervalo QT (parâmetro de que avalia a contração cardíaca) e arritmias, que também é visto para a administração de cloroquina e piperquina (SAUNDERS, 2017). Os derivados da ferroquina têm sido estudados devido à apresentação de resultados melhores que os da ferroquina e cloroquina (WANI et al., 2015).

Recentemente, outros trabalhos de quimioterapia antiplasmodial que utilizam moléculas híbridas têm obtido sucesso. Salahuddin e colaboradores (2013)

verificaram que a hibridização de compostos de derivados de 4-aminoquinolinas com sulfonamidas poderiam ter atividade contra protozoários como o plasmódio e amebas que causam infecção humana.

Maurya e colaboradores (2017) verificaram que uma nova série química de híbridos de 4-aminoquinolinas-pirimidinas N-substituídas teve boa atividade antiplasmodial *in vitro* contra cepas cloroquina-sensível (clone D6) e cloroquina-resistente (clone W2) em concentrações micromolares. Além disso, apresentou baixa toxicidade quando avaliada em culturas de células Vero (células epiteliais de rins de macaco verde africano).

Outras observações deste estudo mostram que o melhor composto apresentou mecanismo de ação similar aos das 4-aminoquinolinas conhecidas e boa predição dos seus parâmetros farmacocinéticos.

2 JUSTIFICATIVA

A malária é uma enfermidade que acomete a humanidade há centenas de anos, e ainda permanece nos tempos atuais levando a casos de morbidade e mortalidade. Apesar dos esforços não há controle adequado do vetor e nem existe vacinas eficientes e disponíveis para prevenção da doença, limitando os recursos de combate à doença.

A quimioterapia antimalárica com cloroquina é muito eficiente, porém nas últimas décadas mostrou falhas com o surgimento de cepas resistentes de *Plasmodium*. Dessa forma, é necessária a busca de novos fármacos que sejam capazes de eliminar a infecção. Mesmo com o surgimento de casos de resistência a cloroquina, o desenvolvimento de novos compostos com base na estrutura das quinolinas é importante.

A química medicinal tem usado técnicas de hibridização de grupamentos químicos com atividade farmacológica para gerar novos compostos com potencial atividade antimalárica. Nessa técnica a molécula final pode ter a atividade inicial de cada grupo bioativo, ou ainda uma atividade sinérgica dos grupos em apenas um composto (FORTIN e BÉRUBÉ, 2013).

Assim, com base nesses conhecimentos, este trabalho propõe avaliar a atividade antiplasmodial de novos compostos que foram elaborados a partir da técnica de hibridização, tendo como grupo farmacofórico principal o anel quinolínico ligado por meio de hidrazonas ou iminas a grupos aromáticos.

3 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antimalárica, citotoxicidade e mecanismo de ação de novos derivados sintetizados por hibridização do anel 4-aminoquinolínico com substituintes hidrazonas e iminas, através de técnicas *in silico*, *in vitro* e *in vivo*.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Análisar *in silico* as propriedades físico-químicas, farmacocinéticas e mecanismo de ação dos derivados 4-aminoquinolínicos.
2. Avaliar *in vitro* a citotoxicidade dos compostos em hemácias humanas, células Vero e WI26VA4.
3. Avaliar a atividade esquizonticida *in vitro* e *in vivo* dos derivados 4-aminoquinolínicos.
4. Avaliar *in vitro* as alterações de pH do vacúolo digestivo dos parasitos após tratamentos com os derivados *in vitro*, através de microscopia confocal.
5. Avaliar a morfologia do baço e fígado obtidos por cortes histológicos e corados com hematoxilina e eosina, após diferentes tratamentos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

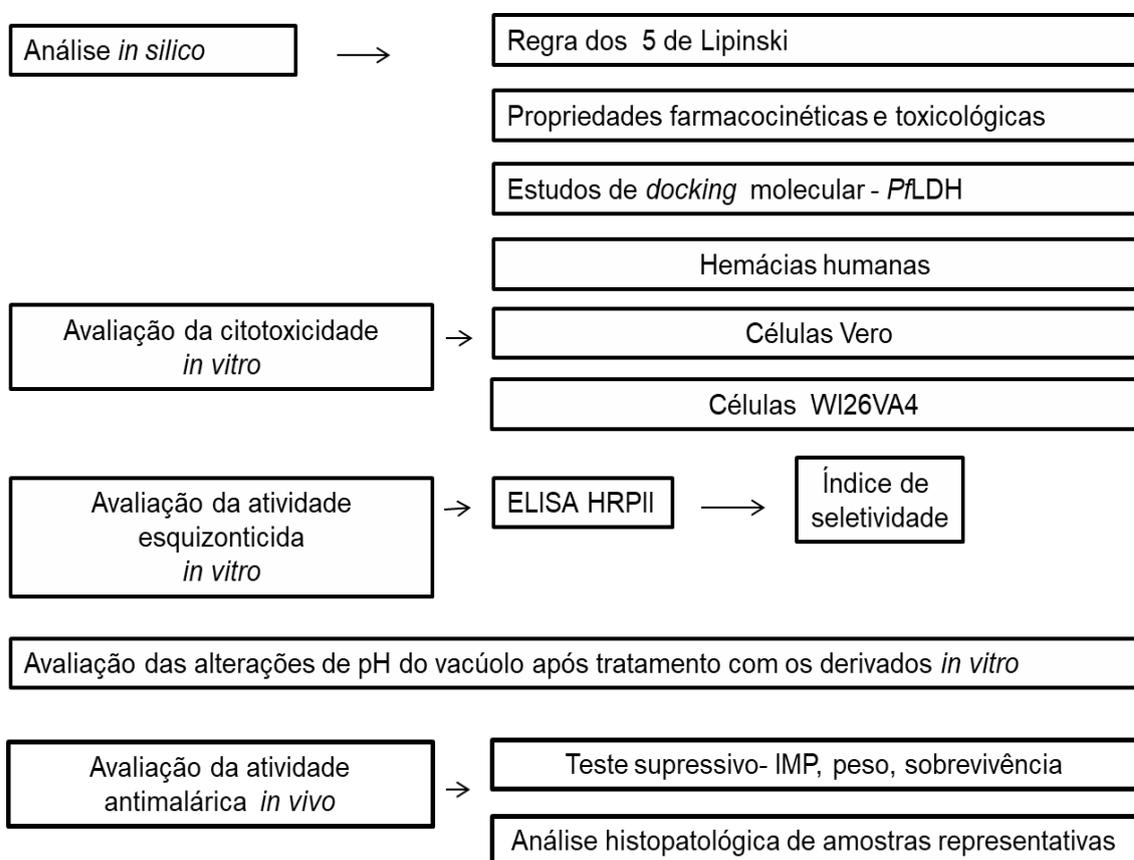


Figura 10: Delineamento experimental. Fonte: Próprio autor

4.2 SÍNTESE DOS DERIVADOS 4-AMINOQUINOLÍNICOS

Os compostos químicos usados neste trabalho foram sintetizados no Núcleo de Pesquisas Químicas da Universidade Federal de Juiz de Fora do Instituto de Ciências Exatas (Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF), sob orientação do Prof. Dr. Adilson David da Silva. Sua produção foi baseada no conceito de hibridização molecular, onde ocorre a junção de dois grupos bioativos através de um grupamento espaçador produzindo moléculas híbridas.

A síntese teve como grupamento de partida o anel quinolínico (formado pela junção de um anel pirimídico e um anel benzeno) ao qual foi adicionado a diferentes grupos aromáticos utilizando diferentes substituintes (hidrazonas ou iminas).

Foram realizadas duas rotas sintéticas, gerando dois grupos de compostos. Na primeira, foram produzidas cinco moléculas, que pertencem ao grupo químico, aqui denominado de H, representado pelas substâncias H1, H2, H3, H4 e H5, que foram sintetizados através da conjugação do anel quinolínico a grupamentos aromáticos por meio de ligações hidrazona, que é caracterizada pelo esqueleto $R_1R_2C=N-NR_3R_4$. Em 2016, foi publicada pelo Núcleo de pesquisas em parasitologia a síntese da série com substituintes hidrazonas e que mostraram efeito antileishmanial (ANTINARELLI, 2016).

Os compostos I1, I2, I3, I4, I5, I6 e I7, denominados aqui como grupo químico I, tiveram como espaçadores um grupamento imina, também chamado de bases de Schiff, caracterizadas pelo esqueleto $-HC=N-$. Os compostos utilizados nesse estudo são apresentados na tabela 2.

Tabela 2: Fórmulas estruturais dos derivados sintetizados por duas rotas sintéticas distintas. Os derivados cuja hibridização foi realizada com grupamento hidrazona, pertence ao grupo H, e os que tiveram o processo de hibridização pelo grupamento imina, pertencem ao grupo I.

Grupo H - Substituintes Hidrazonas		Grupo I - Substituintes Iminas	
Código	Fórmula estrutural	Código	Fórmula estrutural
H1		I1	
H2		I2	
H3		I3	
H4		I4	
H5		I5	
		I6	
		I7	

Fonte: Prof. Dr Adilson David da Silva

4.2 ESTUDOS *IN SILICO* DOS DERIVADOS TESTADOS

4.2.1 ANÁLISE DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DOS DERIVADOS TESTADOS

Os compostos foram analisados *in silico* quanto as suas propriedades físico-químicas em relação à regra dos 5 de Lipinski. Foi utilizado o programa *Molsinspiration*, uma plataforma gratuita disponibilizada na internet através do sítio: <http://www.molinspiration.com/>. Nesta, a estrutura química da molécula é desenhada no programa e por ele são calculados os valores de massa molecular, coeficiente de partição (log P), TPSA (área de superfície polar), número de aceptores de hidrogênio (N+O) e número de doadores de hidrogênio (NH+OH), que são os parâmetros necessários para prever se a molécula estudada tem características que podem sugerir que o fármaco pode ser administrado pela via oral. O programa também fornece a notação SMILES da molécula (*Simplified Molecular input line Entry System*), que pode ser usada para entender a natureza da molécula quanto as suas propriedades farmacocinéticas.

Na análise pela regra de Lipinski é avaliado o número de violações a regra quando se considera as seguintes condições: a massa molecular deve ser ≤ 500 g/mol, o $\log P \leq 5$, número de doadores de hidrogênio ≤ 5 e número de aceptores de hidrogênio ≤ 10 , a área de superfície polar $\leq 140\text{Å}$ (LIPINSKI et al., 1997).

4.2.2 AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES FARMACOCINÉTICAS DOS DERIVADOS

A notação SMILES gerada no programa *Molinspiration*, é utilizada na plataforma AdmetSAR para avaliação dos parâmetros farmacocinéticos dos compostos. Esta plataforma está disponibilizada gratuitamente na internet, através do sítio <http://lmm.d.ecust.edu.cn/admetsar1> e fornece dados preditivos sobre parâmetros de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade de compostos químicos, que por ventura poderão ser utilizados como fármacos.

4.2.3. ESTUDOS DE DOCKING MOLECULAR PARA AVALIAR POSSÍVEL MECANISMO DE AÇÃO DOS DERIVADOS *IN SILICO*

Os ensaios de docking foram realizados no Departamento de Ciências da Computação da UFJF pela profa. Dra. Priscila V. S.Z. Capriles e Lara de Azevedo Alves.

4.2.3.1 MODELAGEM MOLECULAR

Os ensaios *in silico* foram realizados em colaboração com a professora Dra. Priscila Capriles, do departamento de Computação, UFJF.

O molde para a construção tridimensional (3D) da enzima Lactato desidrogenase de *Plasmodium falciparum* (PfLDH), foi selecionado através do *Protein Data Bank* (PDB) sob o código de 1LDG. A estrutura 3D foi selecionada com base na taxa de identidade e similaridade entre a sequência alvo e molde, e na qualidade de resolução da estrutura molde. A partir do programa PyMOL, versão 1.4.1 (SCHRÖDINGER, 2015), foi gerada a conformação 3D da PfLDH, como um homotetrâmero (figura 11).

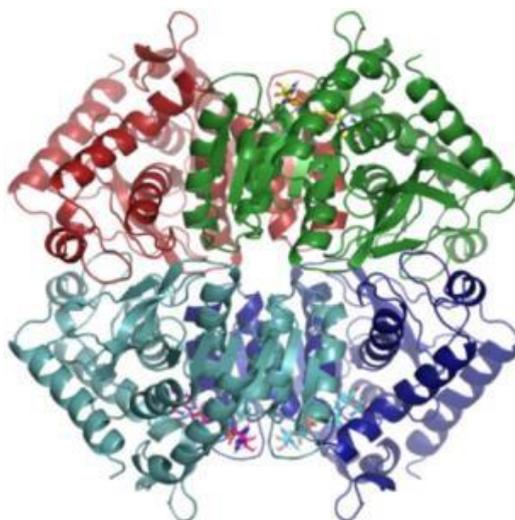


Figura 11: Estrutura tridimensional da enzima PfLDH contendo substrato oxamato e cofator NAD.

Cadeia A em vermelho, B em verde, C em azul claro e D em azul escuro. Fonte: cedido por CAPRILES, P.V.S.Z e ALVES, L.A.; 2019.

4.2.3.2 DOCKING PROTEÍNA-LIGANTE

Para realizar os testes de *docking* molecular foi utilizado o *software* Autodock Vina (TROTT, OLSON, 2009). Os resultados foram ordenados de acordo com seus *scores* e os modos de interação entre a proteína e os ligantes foram avaliados com o programa PyMOL, versão 1.4.1 (SCHRÖDINGER, 2015).

O *score* foi utilizado para obter o valor da constante de inibição calculada computacionalmente (*cKi*). O *cKi* (Eq. 1) representa a quantidade de fármaco necessária para inibir a enzima, expressa em μM .

$$Ki = e^{\left(\frac{\Delta G}{RT}\right)}$$

Onde ΔG é a energia total (*score*), R é o coeficiente de Boltzman e T é a temperatura dada em Kelvin.

4.2.3.3 PREPARO DA PROTEÍNA

A conformação da proteína PfLDH modelada foi preparada para o *docking* no Autodock Tools versão 1.5.6 (SANNER, 1999). Foram retiradas as águas, o substrato oxamato e o cofator NAD, os hidrogênios foram adicionados aos aminoácidos respeitando o estado de protonação dos resíduos, e as cargas foram computadas. Para garantir flexibilidade para a proteína, os seguintes resíduos de interesse foram considerados como flexíveis: LYS91, TRP93, ARG158, ASP155, LEU150, VAL125, ASP90, ASN94, ARG95, LEU96, GLU92, LYS88, ASP97, LEU99 e o resíduo catalítico HIS182 (SHOEMARK, 2007).

4.2.3.4 PREPARO DOS LIGANTES

Os 15 ligantes selecionados (sendo o artesunato, mefloquina e cloroquina os controles utilizados nos testes experimentais) foram desenhados no programa ChemSketch v11.0 (ACD, 2015) e preparados no AutodockTools versão 1.5.6, sendo adicionados os hidrogênios e a flexibilidade na cadeia, e por fim, as cargas foram computadas.

4.2.3.5 PREPARO DA GRID

A *grid* para os cálculos de energia foi construída usando o programa MGLTools versão 1.5.6. O tamanho da *grid* construído para a enzima foi de 34 Å. O centro foi situado próximo ao resíduo catalítico HIS182 (SHOEMARK, 2007) e um

dos anéis do NAD, com discretização de 1 Å, nas coordenadas X = 23.890 Å, Y = 28.090 Å e Z = 38.243 Å.

4.2.3.5 DOCKING RECEPTOR-LIGANTE

As simulações de *docking* receptor-ligante foram realizadas no programa Autodock Vina (TROTT, OLSON, 2009). Todos os ligantes foram testados usando a mesma *grid* e mesmas condições de preparo da proteína PfLDH. Os estudos utilizaram a proteína PfLDH₁ preparada considerando os 15 resíduos flexíveis descritos, contra os 15 ligantes selecionados. Os resultados das poses dos ligantes foram classificados de acordo com a sua posição de encaixe e valores de *score*. As imagens foram geradas utilizando o programa PyMOL, versão 1.4.1 (SCHRÖDINGER, 2015).]

4.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA DOS DERIVADOS QUINOLÍNICOS TESTADOS

Com o objetivo de avaliar se os compostos testados poderiam ser tóxicos por promoverem a lise de eritrócitos humanos, foram coletados 5 ml de sangue O+, de um doador humano saudável e armazenado em tubo revestido por heparina, com o objetivo de evitar o processo de coagulação. O processo de coleta do sangue humano, tanto para os ensaios de hemólise quanto para a cultura de *Plasmodium*, foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa com seres humanos da UFJF, sob o parecer nº 2.160.565.

O sangue foi centrifugado (2000 rotações por minuto - rpm, 5 minutos), sendo o plasma e leucócitos desprezados e, em seguida, ao sangue foram adicionados 5 ml de PBS estéril para lavagem. Após três centrifugações (2000 rpm, 5 minutos) e descarte do sobrenadante, foi obtido um concentrado de hemácias. Foi adicionado o mesmo volume de PBS estéril a esse concentrado de modo que o hematócrito fosse de 50%. Esta solução estoque foi mantida a 4°C para a realização do ensaio.

Quando uma substancia é capaz de provocar a lise de um eritrócito, o conteúdo da hemoglobina é liberado e pode ser quantificada colorimetricamente. Usa-se como comparativo uma substancia que provoca hemólise total, ou seja, 100%, como a saponina, para verificar o percentual de hemólise provocado pelo composto (PAGANO e FAGGIO, 2015). Baseado nesse princípio foi realizado o teste de hemólise.

Conforme Antinarelli e colaboradores (2016), a solução estoque de sangue foi diluída para a concentração final de 1%. Desta, 180 µl foram adicionados em tubos de 1,5 ml para posterior adição de 20µL do composto teste. Para tal, os compostos foram previamente diluídos em DMSO (dimetilsufóxido) e mantidos em estoque na concentração de 0,3M. Uma segunda diluição de cada composto em água foi realizada para que atingisse a concentração de 3000µM.

As drogas foram preparadas, usando uma placa de 96 poços (Costar 3595), com 100 µL de água estéril. Foram adicionados 100 µL do composto na concentração de 3000µM aos poços que já continham 100 µL de água estéril. Em seguida, foi realizada a diluição seriada. Vinte microlitros dos compostos foram diluídos em 180µL de solução de hemácias. As concentrações finais na solução ficaram entre 4,687 µM e 150 µM. Cloroquina foi usada como droga padrão, nas mesmas concentrações; como controle positivo foi usado 20 µL de saponina 1% em água; e como controle negativo, 20 µL de PBS estéril.

Os tubos permaneceram em estufa a 37°C por 16 horas e em seguida foram centrifugados (Thermo Scientific Heraeus Megafuge 16R) a 2000 rpm por 3 minutos. O sobrenadante foi coletado (100 µL) e transferido para uma placa de 96 poços fundo chato (Costar 3695) para realização da leitura a 540nm no

espectrofotômetro (Thermo Multiskan EX). O cálculo do percentual de hemólise foi feito pela fórmula:

$$H\% = \frac{(AT - AN) \times 100}{(AP - AN)}$$

Onde:

AT= média da absorvância do composto teste; AN= média da absorvância do controle negativo; AP= média da absorvância do controle positivo.

4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DOS DERIVADOS TESTADOS

4.4.1 CULTURA DE CÉLULAS VERO

As células Vero constituem um tipo de linhagem celular epitelial isolada do epitélio renal do macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*) e foram gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Elaine Soares Coimbra (NUPEP-UFJF). O cultivo foi realizado em garrafas ventiladas (Corning) contendo meio RPMI1640 (Cultilab), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab), e 0,5% de antibiótico (penicilina e estreptomicina, Sigma-Aldrich). Para manutenção da cultura, as trocas de meio foram realizadas em dias alternados. As garrafas foram mantidas em estufa a 37°C, com 5% de CO₂. Após verificação de 90% de confluência das células aderentes, foi realizado o processo de retirada das células aderidas à placa, utilizando 0,5 ml de tripsina (Cultilab), por 8 min em estufa a 37°C (processo de tripsinização). Após centrifugação (1500 rpm), foi adicionado meio completo (meio RPMI, SFB 10%, 0,5% antibiótico) ao sedimento, e, após homogeneização o conteúdo foi fracionado para novas garrafas (repiques).

4.4.2 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS VERO

Para os testes, garrafas com a cultura foram tratadas com 500µL de tripsina (Cultilab) para promover o desprendimento das células por até 8 minutos. Após esse processo, as mesmas foram colocadas em tubos de 15 ml e centrifugadas a 200g, por 10 minutos. O sobrenadante foi retirado, e foram adicionados 2 ml de meio de cultura ao sedimento.

Uma alíquota de 10µL foi retirada para a contagem das células em câmara de *Newbauer*. Após a determinação do número de células, a cultura foi ajustada para uma concentração de 5×10^5 células por ml. Cem microlitros dessa solução foram adicionados em cada poço de uma placa de 96 poços (Costar 3595). Após este procedimento, a placa foi colocada em estufa a 37°C, com 5% de CO₂ e mantidas até o dia seguinte para aderência das células aos poços.

Passada esta etapa, foi realizada a retirada do meio de cultura, lavagem dos poços com PBS estéril e um novo meio RPMI1640 foi adicionado. Os derivados químicos foram diluídos para a concentração estoque de 0,3M em DMSO, e a partir dela foi realizada uma nova diluição em água estéril para 300µM, de modo que a concentração final de DMSO não fosse superior a 5%. Os derivados na concentração de 300 µM foram adicionados à placa com as células na proporção de 1:2 em relação ao meio de cultura. A partir dessa solução diluição foi feita a diluição seriada, de modo que as concentrações finais dos derivados ficaram entre 4,687 µM e 150 µM.

Após um período de 48 horas de incubação em estufa, foi adicionado 10µl de MTT (Sigma – Aldrich) a 5mg/mL em cada poço. Após 2,5 horas de incubação, a reação foi interrompida pela adição de 100µL de isopropanol/HCl e a leitura foi realizada em espectrofotômetro (Multiskan EX- Thermo Electron Corporation) a 570nm.

O estudo foi realizado em três experimentos distintos e em cada placa as amostras foram distribuídas em duplicata. Como controle positivo, foi usado somente o meio de cultura e como controle negativo, Triton X100 a 0,2% e 0,5%, em

concentrações iguais para os poços testados. Para controle da absorvância gerada pela cor do meio e do corante, foi feito um controle em branco, ou seja, sem as células, e o valor obtido da leitura deste foi posteriormente descontado em todos os demais poços.

Neste teste foi utilizada a cloroquina, como droga padrão, nas mesmas concentrações que os outros derivados, para fins de comparação. Os resultados das absorvâncias foram calculados como percentual de células vivas em relação ao controle positivo pela fórmula:

$$\% \text{Viabilidade} = \frac{\text{Absorvância da média das duplicatas} \times 100}{\text{Absorvância do controle negativo}}$$

Os valores de CC_{50} (concentração que reduz a viabilidade celular em 50%) de cada experimento foram calculados por meio do programa Origin 8.0, e foi realizada a média de dois ou mais experimentos acrescidos do desvio padrão.

4.4.3 CULTURA DE CÉLULAS WI26VA4

O ensaio de citotoxicidade em células WI26VA4, ATCC#CCL-95.1 (fibroblastos de pulmão humano), foi realizado no Laboratório de Bioquímica Medicinal (UFSJ), sob orientação do professor Dr. Fernando de Pilla Varotti.

As células WI26VA4 foram cultivadas em meio RPMI1640 (Vitrocell Embriolife), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Vitrocell Embriolife), em garrafas com filtro (Biofil) e mantidas em estufa contendo 5% de CO_2 , a 37°C. A manutenção da cultura foi realizada a cada dois dias, e, quando houve confluência de mais de 90% das células, as mesmas foram retiradas da placa, utilizando tripsina (conforme descrito anteriormente), divididas e repicadas em novas garrafas.

4.4.4 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS WI26VA4

As células WI26VA4 foram tratadas com 500 µL de tripsina e incubadas por 5 minutos na estufa de CO₂ a 37°C. Após o desprendimento das células do fundo da garrafa, o conteúdo da mesma foi transferido para um tubo de 15 ml e em seguida foi centrifugado a 800g por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e ao sedimento foram acrescentados 2ml do meio de cultura RPMI1640 (Vitrocell Embriolife).

A análise da viabilidade celular foi feita com 50 µl do sedimento ressuspensionado em meio de cultura e 50µL de azul de tripan (Sigma-Aldrich). Foram colocados 10 µl dessa solução na câmara de Neubauer para contagem de células viáveis. Após a obtenção do número de células, foi preparada uma solução com 1×10^5 células/mL e 10% de soro fetal bovino (Vitrocell Embriolife) e 100 µl do meio com as células foram adicionados em cada poço de uma placa de cultura de 96 poços (Kasvi), incubada por 24 horas na estufa de CO₂, a 37°C. Após esse período, o meio foi retirado e foram adicionados 180µL de meio com 1% de SFB.

Os derivados 4-aminoquinolínicos estavam em solução estoque de DMSO a 5 mg/mL. A partir desta, foram preparadas soluções de modo que as concentrações finais na placa de células variavam de 0,01 a 100 µg/mL. Como droga padrão, foi utilizada a cloroquina. Nos poços referentes aos controles negativos foram adicionados 200µL de meio com 1% de SFB.

A placa foi incubada por 48 horas, nas mesmas condições citadas anteriormente. Após esse tempo, foi realizado o ensaio de citotoxicidade pelo método do MTT. O meio de cultura presente na placa foi desprezado e em seguida foram adicionados 100µL de uma solução de MTT a 5mg/mL. A placa foi então incubada por 3 horas. Depois, foi adicionado 50µL de DMSO e após 20 minutos foi realizada a leitura no espectrofotômetro (Biotek Power Wave XS2) no comprimento de onda de 550nm. Com os resultados das absorbâncias foi calculado o percentual de viabilidade celular em relação ao controle positivo pela fórmula:

$$\%Viabilidade = \frac{\text{Absorv\~{a}ncia da m\~{e}dia das duplicatas} \times 100}{\text{Absorv\~{a}ncia do controle negativo}}$$

Os valores de viabilidade e concentraç~{a}o foram analisados no programa Origin 8.0, onde se determinou curvas exponenciais que permitiram o c~{a}lculo dos valores de CC_{50} . Foi realizada a m~{e}dia dos valores de CC_{50} obtida em cada experimento e calculado o desvio-padr~{a}o.

4.5. AVALIAÇ~{A}O ANTIPLASMODIAL *IN VITRO* DOS DERIVADOS QUINOLÍNICOS TESTADOS

4.5.1 CULTURA *IN VITRO* DE *P. falciparum* (CEPA W2)

Os experimentos com cultura *in vitro* foram realizados na Universidade Federal de S~{a}o Jo~{a}o Del Rey (UFSJ), campus Dona Lindu, Divinópolis, Minas Gerais, pela orientaç~{a}o do professor Dr. Fernando de Pilla Varotti.

A cultura cont~{i}nua de *P. falciparum* clone W2 (resistente ~{a} cloroquina) foi mantida conforme o protocolo de TRAGER e JENSEN (1976) com modificaç~{o}es, em meio RPMI 1640 suplementado com HEPES, D-glicose, L-glutamina, hipoxantina, bicarbonato de s~{o}dio, gentamicina, soro humano A+ inativado e hemácias humanas A ou O com o hematócrito de 5%.

A cultura foi realizada em placas de Petri mantidas em estufa a 37°C, em ambiente com a atmosfera adequada de oxigênio obtida pela combust~{a}o de uma vela. Trocas diárias do meio de cultura foram realizadas e a verificaç~{a}o da parasitemia foi feita por meio da confecç~{a}o de esfregaços das hemácias da cultura. Os mesmos foram fixados com metanol e corados com Giemsa. A observaç~{a}o foi feita atrav~{e}s de microscopia ótica, pela objetiva de imers~{a}o.

Para os experimentos foram utilizadas culturas que apresentassem mais de 90% dos parasitos em estágio de anel. Naquelas que isso não foi possível, foi realizado o processo de sincronização com sorbitol (5%) e glicose (0,5%, conforme descrito por Lambros e Vandeberg (1979). Resumidamente, nesse processo ocorre a centrifugação da cultura, descarte do sobrenadante e ao sedimento é adicionado a solução de glicose e sorbitol. Após incubação por 10 min a 37°C, o conteúdo é centrifugado (5 min, 10g), e adicionado meio suplementado e o hematócrito ajustado para 5%. Posteriormente, a cultura é novamente acondicionada em placas e é feito a análise do esfregaço para verificação da sincronização das formas do parasito.

4.5.2 TESTE DE AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMALÁRICA *IN VITRO* PELO ENSAIO DE HRPII (PROTEÍNA 2 RICA EM HISTIDINA)

Para o preparo da placa-teste, a cultura de *P. falciparum* foi ajustada para o hematócrito de 1,5% e parasitemia de 0,05%. Um volume de 180 µL da cultura ajustada foi adicionado aos poços, juntamente com 20µL das drogas já diluídas em placa, conforme no item anterior. A placa permaneceu incubada por 48 horas e em seguida foi congelada e descongelada por duas vezes, para promover o rompimento das hemácias.

Para o ensaio de ELISA, uma placa de 96 poços (Kasvi) foi sensibilizada com 100µl do anticorpo monoclonal primário anti-HRPII (MPFM-55A, ICCLAB®) a 1,35µg/ml. A placa foi incubada a 4°C e no dia seguinte o conteúdo foi descartado e logo foi adicionada uma 200 µL/poço de solução de bloqueio (PBS/BSA2%). A placa permaneceu em temperatura ambiente por 2 horas. Seguiu-se o procedimento de lavagem das placas, três vezes, com PBS-Tween 20 a 0,05%. Na etapa seguinte, 100µL do conteúdo de cada poço da placa-teste (cultura tratada com os derivados), foi adicionada à placa com anticorpo primário. Esta então foi incubada por 1 hora, em câmara úmida, e em seguida foi lavada com PBS-Tween 20 0,05%.

Um volume de 100µL/poço do anticorpo secundário a 0,05µg/mL (MPFG559, ICCLAB®) foi adicionado e foi realizada a incubação por 1 hora. Depois

novamente foram realizadas lavagens e em seguida foi acrescentado 100µL da solução de TMB (3,3,5, -Tetrametilbenzidina) em cada poço. A placa permaneceu em repouso por 10 minutos, protegida da luz, e a reação foi interrompida pela adição de 50 µL de ácido sulfúrico 1M em cada poço. A leitura do teste foi realizada em espectrofotômetro (Biotek Power Wave XS2). O valor de viabilidade do parasito em relação ao controle de 72 horas foi calculado conforme a seguinte fórmula:

$$\% \text{ Viabilidade} = \frac{AC - ABR - ABG}{AC72 - ABG}$$

Onde:

AC: absorvância da média das triplicatas do derivado 4-aminoquinolínico

ABR: absorvância média do branco

ABG: absorvância média do *background*

AC72: absorvância do controle de 72 horas

Os valores de viabilidade em relação à concentração foram analisados no programa Origin 8.0, onde se determinou curvas exponenciais que permitiram o cálculo dos valores de CI_{50} (concentração inibitória que reduz o crescimento do parasito em 50%). Foi realizada a média dos valores de CI_{50} obtida em cada experimento em triplicata e calculado o desvio-padrão.

4.6. CÁLCULO DO ÍNDICE DE SELETIVIDADE

Com base nos valores de CC_{50} obtidos no teste de citotoxicidade em células WI26VA4 e de CI_{50} obtidos no teste antimalárico na cultura de *P. falciparum*, foi calculado o grau de seletividade apresentado por um derivado frente ao parasito, pelo seguinte abaixo. Esta grandeza mensura quantas vezes o candidato à farmaco é mais seletivo ao parasito, do que à célula testada.

IS = $\frac{CC_{50}}{CI_{50}}$ (Concentração que reduz a viabilidade celular em 50%)

CI_{50} (Concentração inibitória que reduz o crescimento do parasito em 50%)

Onde:

IS= Índice de seletividade.

4.7. ENSAIO DE COLOCALIZAÇÃO POR MICROSCOPIA CONFOCAL PARA VERIFICAÇÃO DE ALTERAÇÃO DO PH DO VACUOLO PÓS TRATAMENTO *IN VITRO*

O ensaio foi realizado na Universidade Federal de São Paulo em colaboração com os professores Dr. Marcos Leoni Gazarini Dutra (UNIFESP), Dr. Alexandre Budu (UNIFESP), Msc. Daniel Silqueira Martins Guimarães (FIOCRUZ, MG), Dr. Fernando de Pilla Varotti (UFSJ).

O teste baseia-se no fato da sonda LysoSensor DND-189 (Invitrogen) ser capaz de marcar organelas ácidas e emitir fluorescência. Com a redução da acidez, ocorre menor fluorescência, que pode ser observada por microscopia confocal. Isto pode ocorrer no vacúolo digestivo de *Plasmodium* após tratamento com substâncias capazes de alterar o pH da organela.

Para execução do teste foi mantida a cultura de *P. falciparum* clone W2, sincronizada com predomínio de trofozoítos maduros e com parasitemia de 10 a 15% cultivada em placas, nas mesmas condições descritas anteriormente.

O conteúdo da placa do parasito foi centrifugado por 5 minutos a 9000 x g e o sedimento foi ressuspenso em RPMI, para remoção de plasma humano presente no meio. Foi realizada a contagem das hemácias em câmara de Neubauer e o sedimento foi ajustado para 1×10^7 hemácias/ mL do RPMI, acrescido 2 μ M de fluoróforo (sonda) e 20 mM inibidor de protease (PMSF). A amostra foi incubada a

37° C por 40 minutos. O tubo foi centrifugado três vezes para remoção do excesso de fluoróforo.

Foi utilizada uma placa apropriada para microscopia confocal (*Cell view Glass* - Greiner Bio-one) que foi tratada com Poly-L-Lisina. A ela foram adicionados 200µL da solução com eritrócitos marcados contendo os parasitos com a sonda, e a mesma foi incubada por 5 minutos. O sobrenadante foi removido e lavado com 500µL tampão de marcação (cloreto de sódio, cloreto de potássio, sulfato de magnésio, D-glucose, MOPS- *morpholinopropanesulfonic acid*, cloreto de cálcio) com RPMI sem fenol. A placa foi colocada no microscópio com auxílio de um adaptador.

No microscópio Leica TCSSP8, foram gravadas imagens do contraste de fase, de fluorescência antes e depois da adição dos derivados, nas concentrações dos seus valores de CI_{50} .

Como droga padrão foi utilizada um derivado da artemisinina, o artesunato, uma vez que possui boa atividade contra cepas resistentes a cloroquina e também atua inibindo a formação da hemozoína (HONG et al., 1994).

A fluorescência foi avaliada seguindo os parâmetros de 488nm de excitação e 552 nm de emissão. Os resultados foram analisados no programa Leica Application Suite X onde foram medidos os valores de fluorescência antes e depois da adição do composto, e realizada a diferença entre eles.

4.8 AVALIAÇÃO DA POTENCIAL ATIVIDADE ANTIMALÁRICA *IN VIVO* DOS DERIVADOS 4-AMINOQUINOLÍNICOS TESTADOS

4.8.1 ANIMAIS

Para a realização dos experimentos propostos foi utilizado o modelo murino de infecção para avaliar a atividade antimalárica dos derivados I6 e I7. Foram usados camundongos suíços fêmeas de 4 a 6 semanas de idade, fornecidos pelo Centro de Biologia da Reprodução (CBR) (Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF) e com aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UFJF, sob o parecer nº 042 e 043/2016-CEUA- UFJF (Anexos 02 e 03), e Termo de Prorrogação do Parecer (Anexo 04).

Os animais durante o experimento permaneceram na sala de experimentação do Núcleo de Pesquisas em Parasitologia, em gaiolas armazenadas em estantes ventiladas (ALESCO). Os animais receberam água e ração *ad libidum*.

4.8.2 CEPA DE *Plasmodium berghei* NK65

No modelo de infecção malárica aplicada nesse estudo, foi realizada a infecção dos camundongos com a espécie de *P. berghei* NK65, cloroquina-sensível. A cepa foi mantida viável em animais de manutenção que foram infectados com 200 µL, do sangue de um animal infectado diluídos em uma solução salina.

4.8.3 SOLUBILIZAÇÃO DOS DERIVADOS PARA O TESTE *IN VIVO*

Os derivados do estudo foram diluídos no mesmo dia do início do tratamento dos animais. A cloroquina (Sigma Aldrich) foi diluída em água potável para atingir a concentração de 10mg/kg. O comprimido da associação de artesunato e mefloquina (Farmanguinhos) também foi pulverizado e diluído em água de modo que a concentração final obtida fosse de 5 mg/kg de artesunato e 10 mg/kg de mefloquina.

Os derivados I6 e I7 foram diluídos em 5% de DMSO, e em seguida solubilizados em água filtrada. Devido à disponibilidade restrita de massa, as concentrações finais obtidas para os derivados foram: I6 a 15 mg/kg e I7 a 15 mg/kg e 25 mg/kg.

4.8.4 TESTE SUPRESSIVO

O teste supressivo foi realizado conforme PETERS (1965), com modificações. O sangue da cauda de um animal de manutenção foi coletado e realizado um esfregaço para verificação da parasitemia. Após a análise por microscopia ótica, o sangue desse animal foi puncionado da veia submandibular e em seguida ajustado de modo a obter uma solução de 5×10^6 hemácias parasitadas/ml, em meio RPMI e 10% de soro fetal bovino.

Os animais foram divididos randomicamente em grupos de 5 e, após pesagem, foi realizado o inóculo de 0,2 ml de solução de *P. berghei* NK65 (10^6 hemácias parasitadas) . Após 4 horas da infecção, os animais foram tratados pela via oral (gavagem) com 0,1ml dos derivados diluídos em DMSO e água filtrada.

Foi coletado sangue da veia caudal para confecção dos esfregaços no 5º e 9º dia pós-infecção, que foram fixados com metanol e em seguida corados por Giemsa. A contagem da parasitemia foi realizada observando o número de hemácias

parasitadas em relação às hemácias totais observadas. A sobrevivência e a massa corpórea dos camundongos foram avaliadas durante 30 dias ou até o óbito dos animais.

4.8.5 ANÁLISE DA INIBIÇÃO DA MULTIPLICAÇÃO DO PARASITO (IMP)

A atividade antimalárica dos derivados foi verificada por meio do cálculo de inibição da multiplicação do parasito (IMP), que se baseia pela diferença entre a média da parasitemia do grupo não tratado pela média do grupo testado, dividido pela média da parasitemia do grupo não tratado, expresso em porcentagem, conforme formula abaixo (CARVALHO et al, 1991, ANDRADE-NETO et al., 2003). Os derivados foram considerados ativos, quando a parasitemia foi reduzida em 30% ou mais (CARVALHO et al, 1991).

$$\% \text{ IMP} = \frac{A-B}{A} \times 100$$

Onde:

A: média da parasitemia no grupo de controle negativo

B: média da parasitemia no grupo teste.

IMP: inibição da multiplicação do parasito (%)

4.9 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA REPRESENTATIVA DO BAÇO E FÍGADO DOS CAMUNDONGOS TRATADOS

Foi realizada a infecção dos animais com *P. berghei*, conforme modelo do teste supressivo de Peters, descrito no item **4.8.4**. No décimo segundo dia pós-infecção (12^o d.p.i.), os animais foram eutanasiados por sobredose anestésica de

cetamina e xilasina, aplicada pela via intraperitoneal, seguida de exsanguinação, realizada por punção cardíaca.

Após verificação do óbito, foi realizada a abertura da cavidade abdominal e recolhidos o baço e fígado dos camundongos. As peças anatômicas foram embebidas em solução de formol tamponado 10% com solução salina (PBS), a fim de manter sua preservação.

A preparação das peças anatômicas para análise histológica foi realizada no laboratório de Técnicas Histológicas, do departamento de Morfologia, da UFJF, sob a orientação da prof.^a Dra. Flavia de Paoli.

Após o processamento dos órgãos, os mesmos foram incluídos em parafina e cortes com 4µm de espessura foram realizados. Em seguida as lâminas foram coradas em hematoxilina e eosina (H e E).

Para apresentar de forma qualitativa e representativa o perfil histológico do baço e fígado dos tratamentos, foi escolhido um animal por grupo, que melhor representasse a média de parasitemia do seu tratamento no 12º d.p.i. Os cortes histológicos obtidos foram utilizados para representar a influência do tratamento na saúde desses órgãos e que poderia influenciar no contexto da infecção.

Para o baço foram analisados parâmetros como tamanho da cápsula, organização da polpa vermelha, polpa branca, e pigmentos de hemozoína e para o fígado, foram observados presença do pigmento malárico, presença ou não de vacuolização, infiltrado inflamatório e aspecto dos sinusóides hepáticos. Aspectos estruturais de forma geral foram comparados entre os grupos tratados e não tratados.

Os cortes foram visualizados no microscópio Olympus BX 53, em objetivas de equipado com a câmera digital DP 73. Para análise do baço foi usada a objetiva 10x e para o fígado a de 20x.

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para os dados obtidos nos experimentos de citotoxicidade e atividade antimalárica *in vitro* foi calculada a média de dois ou três experimentos em triplicata e calculado o desvio-padrão. Foi realizada análise de variância (ANOVA), com pós-teste de Tukey, para comparação dos dados de citotoxicidade (CC₅₀) e atividade *in vitro* (CI₅₀). Valores de P menores que 0,05% foram considerados significativos. Os testes estatísticos foram realizados utilizando o programa *GraphPad Prism 5.0*.

Para o ensaio de colocalização em microscopia confocal foram realizadas triplicatas e em cada experimento os parasitos presentes no campo foram analisados de forma independente. As médias de fluorescência dos valores obtidos forma analisadas por ANOVA, seguido pelo *Newman Keuls Multiples Comparision Test*. Valores de P menores que 0,05% foram considerados significativos.

Nos ensaios *in vivo* a análise de sobrevivência foi realizada utilizando o teste de Mantel-Cox e o peso foi verificado dia a dia por ANOVA e teste de Tukey. Em todos os testes, valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Os gráficos de análise de peso e sobrevivência foram elaborados utilizando o programa *GraphPad Prism 5.0*.

5 RESULTADOS

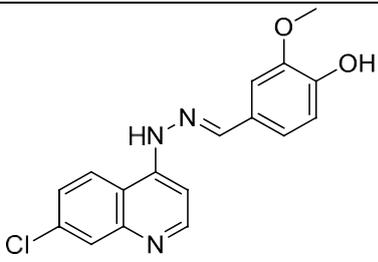
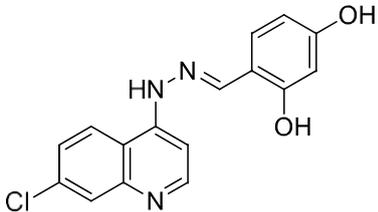
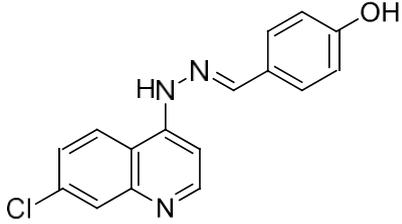
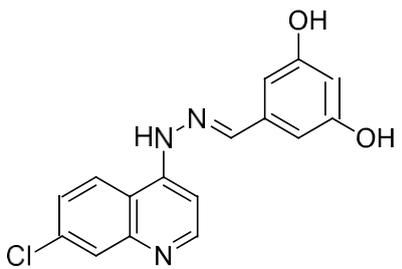
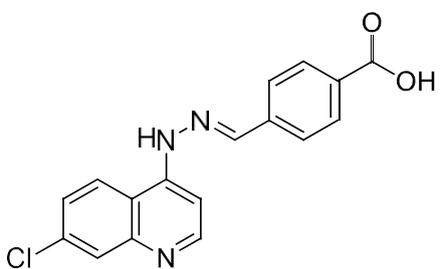
5.1 AVALIAÇÃO *IN SILICO* DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DOS DERIVADOS DE 4-AMINOQUINOLINAS

Como a via oral de administração é a primeira escolha durante o desenvolvimento de um fármaco, questões relacionadas à solubilidade são de extrema importância para avaliação de um novo candidato (LIN et al., 2003, MODA, 2011).

A regra de 5 de Lipinski é uma ferramenta que avalia 4 parâmetros físico-químicos que podem prever se a molécula estudada tem boa biodisponibilidade para ser administrada pela via oral, pois analisa aspectos relativos a absorção e permeabilidade do fármaco (LIPINSKI et al., 1997). Segundo esta regra, o composto para ter uma boa absorção, deve ter peso molecular menor ou igual a 500 g/mol, coeficiente de partição octanol/água (Clog P) menor ou igual a 5, número de doadores de hidrogênio (NH+OH) menor ou igual 5 e número de aceptores de hidrogênio (N+O) menor ou igual a 10 (LIPINSKI et al, 1997).

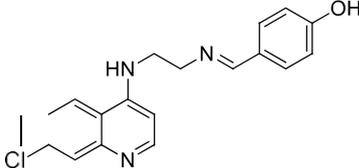
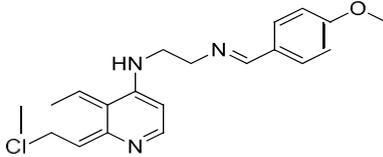
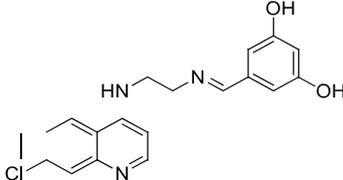
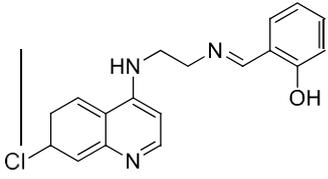
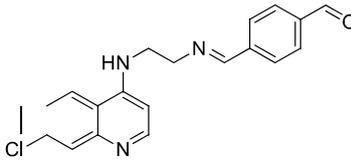
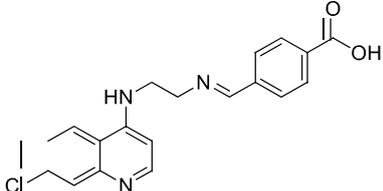
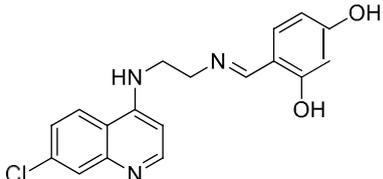
Antes de avaliar a eficácia dos compostos em modelo antiplasmodial *in vitro* e *in vivo*, aspectos físico-químicos foram estudados para verificar se atendiam aos requisitos da regra dos 5 de Lipinski e, portanto, se poderiam ser administrados pela via oral. Foi usado o programa *Molinspiration* para obtenção desses dados (Tabela 3 e 4).

Tabela 3: Avaliação *in silico* através da regra dos 5 de Lipinski, das propriedades físico-químicas das moléculas sintéticas derivadas de 4-aminoquinolinas, com substituinte hidrazona. Resultados obtidos pelo programa *Molinspiration online*.

Derivado 4-aminoquinolínico	Fórmula estrutural	Log P	MM	nON	nOHNH	NV
H1		4,99	327,77	5	2	0
H2		5,09	313,74	5	3	1
H3		5,17	297,75	4	2	1
H4		4,62	313,74	5	3	0
H5		5,56	325,75	5	2	1

Log P: Coeficiente de partição; MM: massa molecular; nOH: número de aceptores de hidrogênio ; nOHNH: número de doadores de hidrogênio; NV: número de violações à regra de Lipinski. Fonte: próprio autor.

Tabela 4: Avaliação *in silico* das propriedades físico-químicas das moléculas sintéticas derivadas de 4-aminoquinolinas, com substituinte imina. Resultados obtidos pelo programa *Molinspiration online*.

Derivado 4-aminoquinolínico	Fórmula estrutural	Log P	MM	nON	nOHNH	NV
11		3,67	325,80	4	2	0
12		4,2	339,83	4	1	0
13		3,12	341,80	5	3	0
14		4,09	325,80	4	2	0
15		3,94	337,81	4	1	0
16		4,06	353,81	5	2	0
17		3,58	341,80	5	3	0

Log P: Coeficiente de partição; MM: massa molecular; nOH: número de aceptores de hidrogênio; nOHNH: número de doadores de hidrogênio; NV: número de violações à regra de Lipinski. Fonte: próprio autor.

Os derivados H2, H3 e H5, apresentaram uma violação à regra de Lipinski (tabela 3) relacionada ao valor do coeficiente de partição que foi um pouco superior a cinco. O coeficiente de partição (Clog P) expressa a lipossolubilidade do composto. Neste caso, as moléculas acima citadas apresentam-se mais lipofílicas que os demais derivados da série e, portanto, podem ter maior dificuldade para serem absorvidas pelas células.

Quando a regra foi avaliada entre os derivados do grupo I (tabela 4), foi visto que nenhum desses apresentou qualquer violação, assim de acordo com Lipinski e colaboradores (1997), todos têm boa predição para serem administrados pela via oral e podem apresentar boa disponibilidade.

5.2 AVALIAÇÃO *IN SILICO* DAS PROPRIEDADES FARMACOCINÉTICAS DOS DERIVADOS 4-AMINOQUINOLÍNICOS

Continuando a análise *in silico*, foram avaliadas as propriedades farmacocinéticas de todos os derivados (tabela 5), através do programa AdmetSar (LMMD - *Laboratory of Molecular Modeling and Design*), disponível gratuitamente na internet (<http://lmmd.ecust.edu.cn/admetsar1>). O programa fornece parâmetros que predizem o comportamento da molécula testada avaliando parâmetros de absorção, distribuição, metabolismo e excreção.

A notação SMILE do derivado, fornecida pelo programa *Molinspiration*, foi aplicada no programa AdmetSar. Após sua análise, a plataforma mostrou que todos os derivados possuem alta probabilidade de ter absorção na barreira hematoencefálica e nas células intestinais humanas (tabela 5). Esta observação demonstra que, além de serem absorvidos pelo intestino e alcançar a circulação sanguínea, os derivados também são permeáveis à barreira hematoencefálica.

Modelo avaliado/ derivado	H1	H2	H3	H4	H5	I1	I2	I3	I4	I5	I6	I7
	Toxicidade											
Toxicidade AMES	T	NT	T	T	NT	T	T	T	T	T	NT	T
Carcinogênico	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não
Toxicidade Oral Aguda	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III

NS: não substrato

NI: não inibidor

I: Inibidor

E: elevada

B: baixa

T: tóxico

NT: não tóxico

III: escala 3 nos nível de toxicidade aguda oral

Sinal "+" indica que o composto é permeável no modelo, e sinal "-", o composto não é permeável

Fonte: resultados obtidos na plataforma AdmetSar

A predição mostrou que o grupo H contém moléculas que podem ser permeáveis às células Caco-2 e o mesmo ocorreu para I5 do grupo I.

Após absorção pelo organismo, os compostos podem ser metabolizados por diversas enzimas, como as que estão presentes no complexo citocromo P450, e aí sofrerem processo de oxidação e conjugação. Muitos fármacos podem sofrer metabolização pelas frações da CYP, atuando como substratos, mas também podem atuar como inibidores. A inibição de isoformas das enzimas do complexo pode gerar interações com a administração conjunta de diferentes substâncias e o uso simultâneo pode levar a falha na metabolização ou no acúmulo delas.

Assim, durante o metabolismo os derivados deste estudo também podem ora atuar como substrato, ora como inibidor de diversas enzimas do citocromo P450 (tabela 5). Todos os são potenciais inibidores da CYP4501A2. Os derivados H1, H2, H4 e H5 são inibidores da CYP4502C9. Todos, com exceção de H5 e I6 são inibidores de CYP4502D6. Os derivados do grupo H, exceto H5, e I2 são inibidores da CYP4502C19. A CYP450 3A4 pode ser inibidas por todas do grupo H e por I2.

Outros parâmetros analisados foram a carcinogenicidade e mutagenicidade, que poderiam ser induzidas após administração dos derivados. Conforme a análise,

nenhuma substância do estudo apresentou potencial carcinogênico. Outro teste realizado para avaliar a toxicidade é o parâmetro de toxicologia AMES, que avalia a capacidade de um composto em induzir mutações em *Salmonella* (revisto por LAVANDEIRA, 2014). Os derivados H2, H5, I6 não tiveram relação com esta toxicidade. Apesar de esta observação ter sido relatada, é necessária a realização de testes *in vitro* que possibilitem a confirmação desta hipótese.

Em relação à toxicidade oral aguda, os derivados se apresentaram na categoria III, que contempla substâncias com valores de DL50 entre a 500 mg/kg e 5000 mg/kg (NRCS & KRAMER, 2014). Visto que durante os testes *in vivo* com antimaláricos, é recomendado o uso em doses de até 50mg/kg (KATSUNO, 2015), podemos prever que futuras análises usando até 50mg/kg, podem ser seguras, e não causar toxicidade aos animais.

5.3 ESTUDOS DE *DOCKING* MOLECULAR ENTRE OS DERIVADOS 4-AMINOQUINOLÍNICOS E PROTEÍNA LDH PLASMODIAL

No interior dos eritrócitos, *P. falciparum* realiza glicólise anaeróbia para sintetizar ATP e obter energia. Para isso, a enzima LDH é fundamental e tem mostrado ser alvo de ação de fármacos como a cloroquina e mefloquina. Baseado nesse conhecimento foi realizado ensaios de *docking* molecular *in silico* para avaliar possíveis interações entre os derivados quinolínicos e esta proteína.

As análises de *docking* receptor-ligante realizadas pelo *software* Autodock Vina (TROTT, OLSON, 2009) consideraram os ligantes e alguns resíduos da proteína PfLDH citados anteriormente como flexíveis. Na tabela 6 está um resumo dos resultados obtidos por este programa como a pontuação do *docking*, interação com resíduos catalíticos e *Ki* calculado (*cKi*).

Tabela 6: Estudos de *docking* molecular entre os derivados quinolínicos dos grupos H e I com a proteína LDH de *P. falciparum*.

Ligantes	Afinidade (kcal/mol)	Interações	Constante de inibição calculado - <i>cKi</i> (μM)
Cloroquina	-6.9 (Pose 1)	ARG158, LEU150, VAL125, HIS182, ARG95, ASN94 e TRP93.	8,7544
Artesunato	-6.2 (Pose 5)	VAL125, LEU150, TRP93, HIS182 e ARG95.	28,5322
Mefloquina	-9.3 (Pose 1)	LEU150, VAL125, HIS182, ARG158 e TRP93.	0,1524

Ligantes	Afinidade (kcal/mol)	Interações	cKi (μM)
H1	-7.9 (Pose 1)	ARG158, LEU150, VAL125, HIS182, ARG95, ASN94 e TRP93.	1,6188
H2	-7.2 (Pose 3)	LEU150, VAL125, HIS182, ASN94, ASP97 e TRP93.	5,2762
H3	-5.4 (Pose 11)	LEU150 e VAL125.	110,0890
H4	-6.5 (Pose 6)	LEU150, VAL125, HIS182 e TRP93.	17,1962
H5	-7.3 (Pose 3)	ARG158, LEU150, VAL125, HIS182, ARG95, ASN94 e TRP93.	4,4568
I1	-6.7 (Pose 2)	ARG158, VAL125, HIS182, ASP155, ARG95, ASN94 e TRP93.	12,2696
I2	-6.3 (Pose 5)	LEU150, VAL125, HIS182 e TRP93.	24,1009
I3	-8.7 (Pose 1)	VAL125, TRP93, HIS182 e ASN94.	0,4196
I4	-8.1 (Pose 1)	ARG158, LEU150, VAL125, HIS182 e TRP93.	1,1550
I5	-6.7 (Pose 4)	VAL125, HIS182, LEU150, ARG158 e TRP93.	12,2696
I6	-8.2 (Pose 1)	VAL125, HIS182, ARG158 e TRP93.	0,9756
I7	-7.6 (Pose 1)	ARG158, VAL125, TRP93 e HIS182.	2,6860

Conforme observado na tabela 6, os valores de afinidade em torno de -8 kcal/mol representam boas ligações entre as moléculas e os resíduos da proteína LDH, porém isso não foi observado para H3 que mostrou uma baixa energia de interação.

Os derivados H1, I3, I4, I6 e I7 apresentaram os menores valores de constante de inibição (cKi), mostrando que provavelmente necessitam de menor concentração de fármaco, quando comparado aos outros compostos, para ter ação.

No estudo foi observada a interação das drogas padrão: cloroquina, artesunato e mefloquina (figura 11) e os derivados de forma geral, apresentarem conformação espacial semelhante à interação da mefloquina com os resíduos de proteína (figuras 12, 13, 14 e 15).

Quando o posicionamento das moléculas é avaliado em conjunto é perceptível que não houve variação brusca nas conformações, o que demonstra um padrão na forma que os ligantes se estabilizam no sítio (figura 15 P).

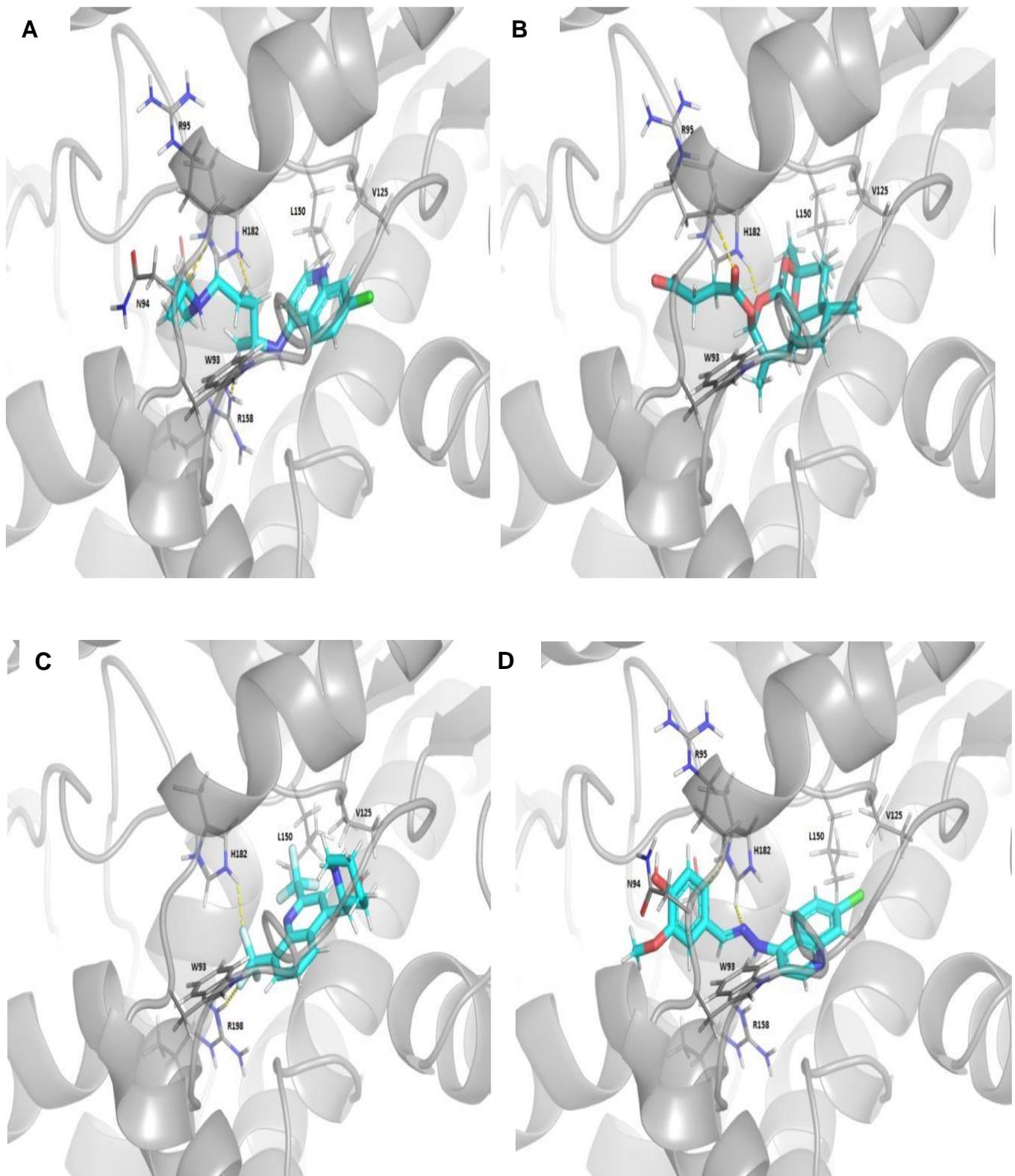


Figura 12: Representação do *docking* entre o controle cloroquina (A), artesunato (B), mefloquina (C), H1 (D) e a enzima PfLDH.

Fonte: cedido por CAPRILES, P.V.S.Z e ALVES, L.A.; 2019.

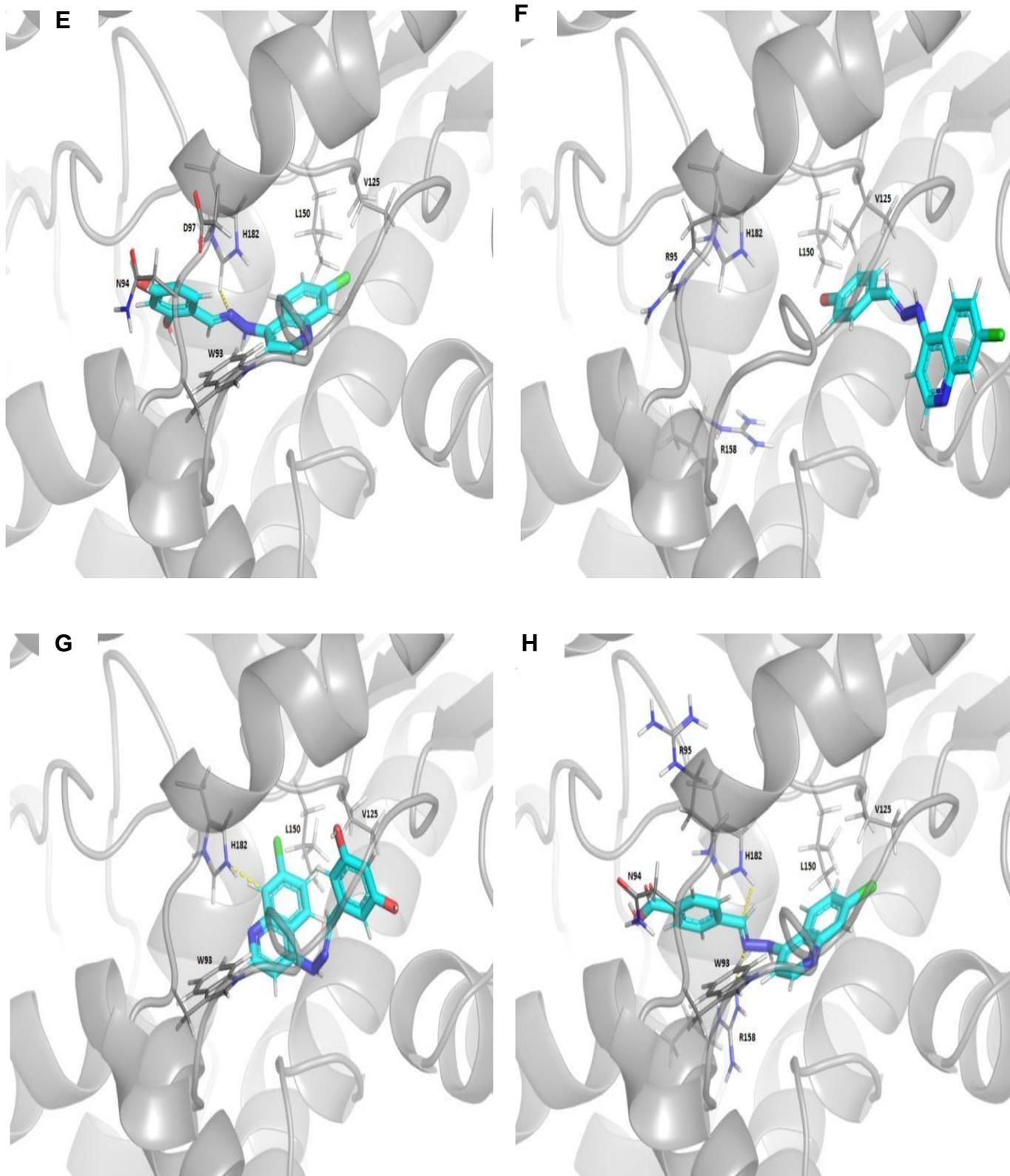


Figura 13: Representação do *docking* entre o derivado 4-aminoquinólico H2 (E), H3 (F), H4 (G), H5 (F) e a enzima PflDH.

Fonte: cedido por CAPRILES, P.V.S.Z e ALVES, L.A.; 2019.

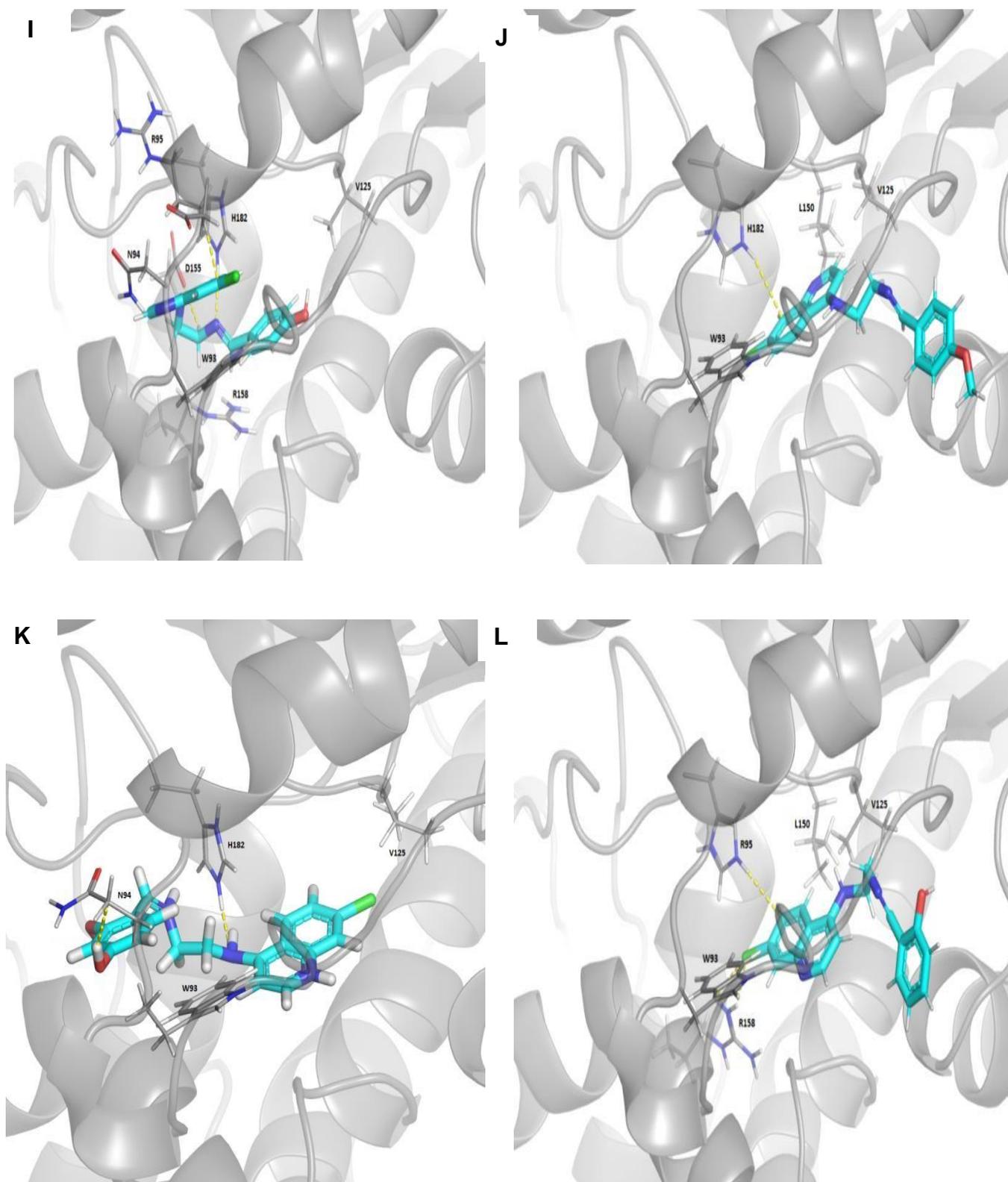


Figura 14: Representação do *docking* entre o derivado 4-aminoquinolínico composto I1 (I), I2 (J), I3 (K), I4 (L) e a enzima PflDH.

Fonte: cedido por CAPRILES, P.V.S.Z e ALVES, L.A.; 2019.

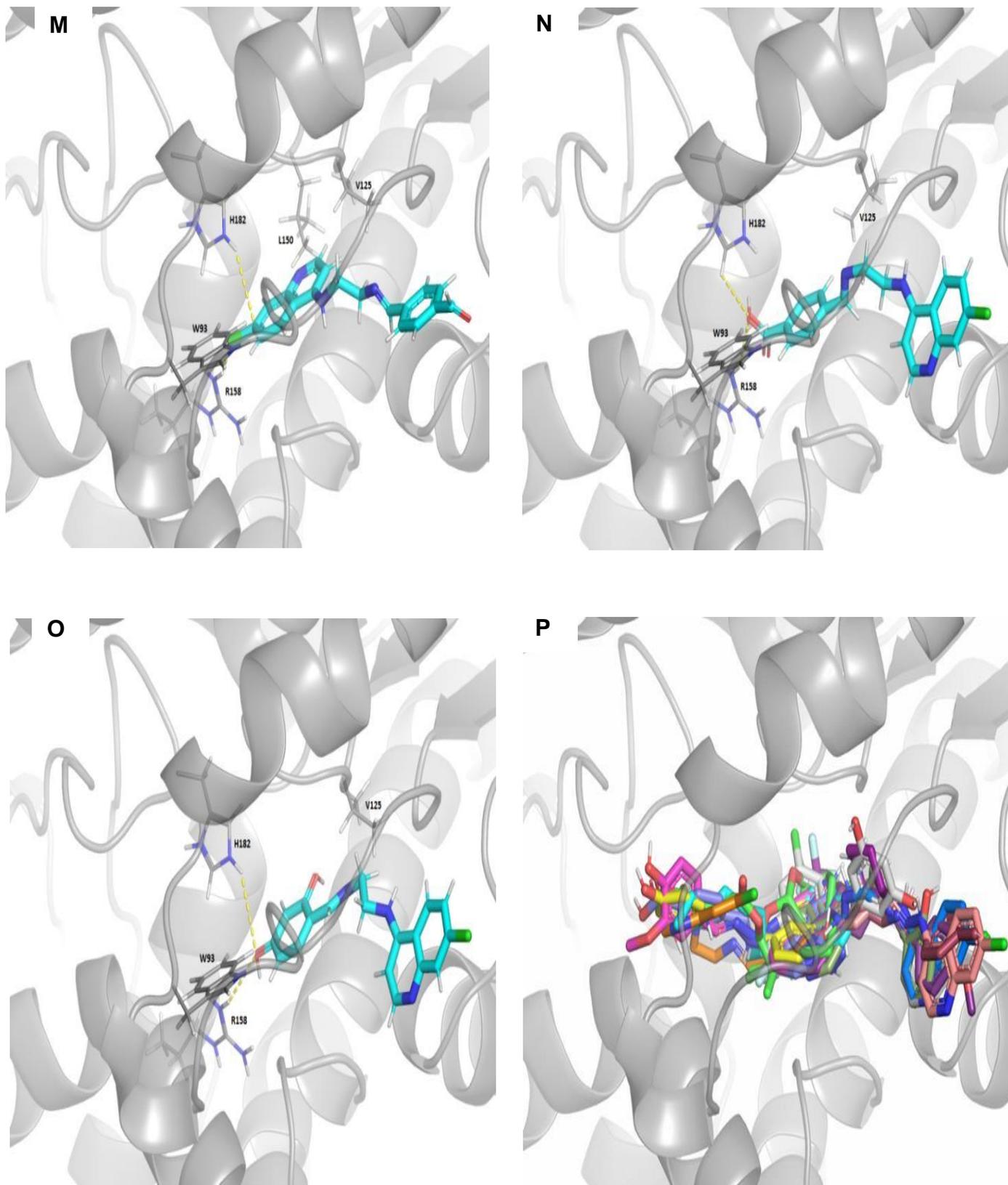


Figura 15: Representação do *docking* entre o derivado 4-aminoquinolínico I5(M), I6 (N), I7 (O) e a enzima PflDH. Posicionamento dos derivados no sítio ativo da enzima (P).

Fonte: cedido por CAPRILES, P.V.S.Z e ALVES, L.A.; 2019.

5.4 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS DERIVADOS DE 4-AMINOQUINOLINAS EM ERITRÓCITOS HUMANOS

A partir do conhecimento que o parasito causador da malária vive grande parte do seu ciclo no interior das hemácias, e nelas exerce suas funções metabólicas e de multiplicação por esquizogonia. Assim, este grupo celular torna-se alvo para ação dos fármacos antimaláricos. Nesse sentido, os dois grupos de derivados 4-aminoquinolínicos testados neste trabalho foram avaliados em diferentes concentrações de soluções com hemácias humanas.

Os ensaios de citotoxicidade mostraram que nenhum derivado causou mais que 10% de hemólise nos dois grupos de moléculas. Devido a isso não foi possível calcular o valor de HC_{50} , ou seja, a concentração capaz de provocar lise de 50% das hemácias, mas sabe-se que para todos os derivados, este valor é superior a 150 μM , que foi a máxima concentração testada.

A seguir são apresentados os percentuais de hemólise obtidos quando os derivados foram testados na concentração de 150 μM (figuras 16 e 17).

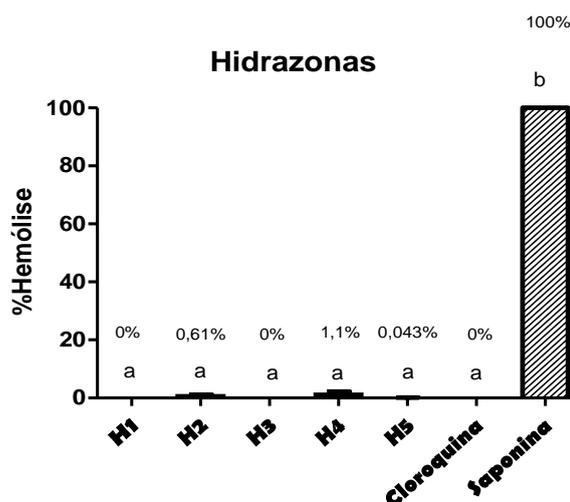


Figura 16: Percentual de hemólise após a adição dos derivados com substituintes hidrazonas (grupo H) na concentração de 150 μM .

Para determinação do percentual médio de hemólise foram realizados de 2 a 3 experimentos em duplicatas. As médias das absorvâncias dos derivados testados em sua maior concentração foram expressas como média \pm desvio padrão. Foi usado ANOVA seguida do teste de Tukey para realizar a comparação das médias. As médias com letras diferentes são estatisticamente diferentes entre si ($p < 0,05$). Fonte: próprio autor

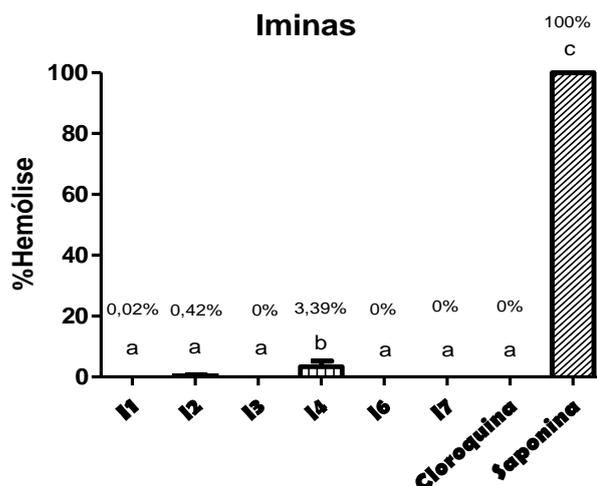


Figura 17: Percentual de Hemólise após a adição dos derivados com substituintes iminas (Grupo I) até na concentração de 150 μ M.

Para determinação do percentual médio de hemólise fora, realizados de 2 a 3 experimentos em duplicatas. As médias das absorvâncias dos derivados testados em sua maior concentração foram expressas como média \pm desvio padrão. Foi usado ANOVA seguida do teste de Tukey para realizar a comparação das médias. As médias com letras diferentes são estatisticamente diferentes entre si ($p < 0,05$). I5 não foi testado. Fonte: próprio autor.

Quando os diferentes percentuais são analisados entre si, é possível observar que a média de todos os derivados foi significativamente diferente dos resultados obtidos pela adição de solução de saponina, que foi usada como controle positivo.

No grupo de moléculas com substituinte hidrazona, a média do percentual de hemólise foi estatisticamente semelhante entre si e com os resultados obtidos com a cloroquina, porém diferentes, quando a análise foi realizada com a saponina.

Entre o grupo de iminas, a média do percentual de hemólise foi semelhante entre as moléculas I1, I2, I3, I6, I7 e a cloroquina. Comparando com as demais, um percentual de hemólise maior foi observado para I4. Apesar de estatisticamente diferente dos demais derivados, o valor de 3,39% apresentado pelo composto I4 é inferior ao controle positivo e está no limite inferior a 10%, o que representa que este composto não é tóxico para as hemácias (PAGANO e FAGGIO, 2015), neste estudo.

Os dados observados sugerem que as substâncias pertencentes a estes diferentes grupos podem ser usadas no teste *in vivo*, uma vez que não provocam o rompimento das hemácias e, assim, qualquer atividade antimalárica que for

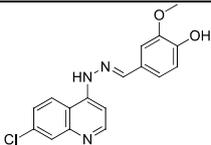
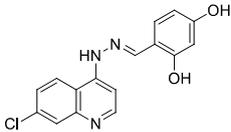
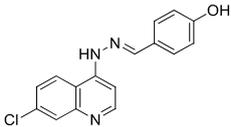
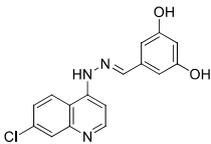
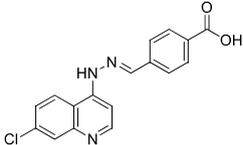
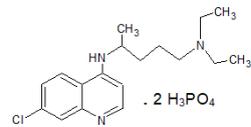
observada durante o tratamento com esses derivados pode ser atribuída a eles e não devido a um processo hemolítico de forma inespecífica, o que poderia ser muito prejudicial ao hospedeiro.

5.5 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE EM DIFERENTES CULTURAS DE CÉLULAS

O termo citotoxicidade está relacionado aos danos celulares provocados por determinados agentes a células, como alterações na permeabilidade celular, inibição enzimática, morte celular, entre outros. Com o objetivo de avaliar os possíveis prejuízos que estes agentes poderiam causar em células de mamíferos, foi realizado teste de MTT em cultura de células. Este ensaio consiste na conversão do sal 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil tetrazólico (MTT- Sigma) em cristais de formazan roxo insolúveis, através da ação de desidrogenases mitocondriais de células viáveis em proliferação. A espectrofotometria foi utilizada para quantificar a produção dos cristais (PIETERS et al. ,1988).

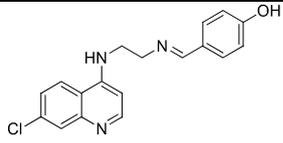
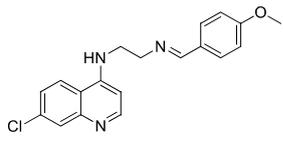
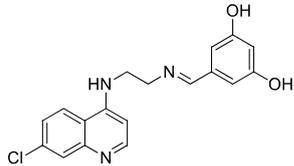
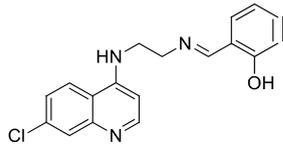
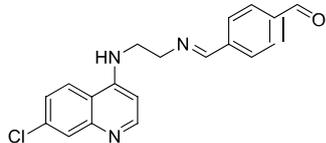
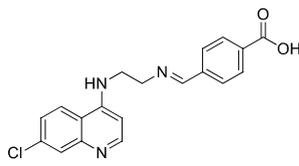
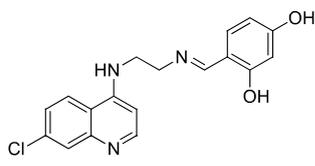
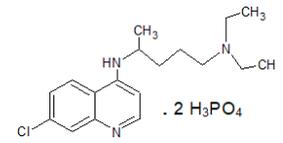
Inicialmente, para avaliar os valores de CC_{50} , os derivados 4-aminoquinolínicos foram testados em células epiteliais de rim de macaco, as células Vero. No teste os derivados deste estudo e a cloroquina não foram citotóxicos até a concentração de 150 μ M. Em seguida, foi realizado o mesmo teste em fibroblastos de pulmão humano, células WI26VA4. Para estas foi possível quantificar valores de CC_{50} (tabela 7 e 8).

Tabela 7: Avaliação da citotoxicidade dos derivados 4-aminoquinolínicos do grupo H (CC₅₀) em células Vero e WI26VA4.

Derivado	Fórmulas estruturais	CC ₅₀ Vero (μM)	CC ₅₀ WI 26VA4 (μM)
H1		>150	10,77±1,58 ^b
H2		>150	7,275±0,544 ^b
H3		>150	2,42±0,48 ^b
H4		>150	12,89± 0,2616 ^b
H5		>150	82,04±12,87 ^a
Cloroquina		>150	>19,38 [*]

Células Vero: células epiteliais de rins de macaco verde africano, células WI26VA4: fibroblastos de pulmão humano. Os valores de CC₅₀ foram expressos como média ± desvio padrão. As letras a e b foram utilizadas para comparação estatística entre os valores de CC₅₀ das moléculas. Diferentes letras representam diferenças estatísticas pelo teste de ANOVA, seguido de pós-teste de Tukey, nível de significância de 95%. Valores indeterminados de CC₅₀ (representados por *), não foram avaliados estatisticamente. Fonte: próprio autor.

Tabela 8: Avaliação da citotoxicidade dos derivados 4-aminoquinolínicos do grupo I (CC₅₀) em células Vero e WI26VA4.

Derivado	Fórmulas estruturais	CC ₅₀ Vero (µM)	CC ₅₀ WI 26VA4 (µM)
I1		>150	130,07±55,91 ^{ab}
I2		Nt	>29,42*
I3		>150	79,28±3,72 ^{ab}
I4		Nt	25,33±10,22 ^b
I5		Nt	137,79±46,88 ^{ab}
I6		>150	>28,26*
I7		>150	170,7±14,14 ^a
Cloroquina		>150	>19,38*

Células Vero: células epiteliais de rins de macaco verde africano, células WI26VA4: fibroblastos de pulmão humano Nt: O derivado não foi testado nesse experimento. Os valores de CC₅₀ foram expressos como média ± desvio padrão. As letras a e b foram utilizadas para comparação estatística entre os CC₅₀ das moléculas. Diferentes letras representam diferenças estatísticas pelo teste de ANOVA, seguido de pós-teste de Tukey (p<0,05), intervalo de confiança de 95%. Valores indeterminados de CC₅₀ (representados por *), não foram avaliados estatisticamente. Fonte: próprio autor.

Quando os valores de citotoxicidade foram comparados entre si no grupo H, foi observado estatisticamente que o CC₅₀ de H5 era diferente dos demais da série e apresentava menor toxicidade para as células WI26VA4.

O grupo de moléculas derivadas de iminas, em geral, obteve valores de CC₅₀ superiores aos derivados com substituinte hidrazona, sugerindo que este substituinte pode levar a uma citotoxicidade menor quando comparado aos derivados do outro grupo. Isso pode ser observado entre as moléculas H2 e I7, H3 e I1, H4 e I3, H5 e I6, cuja diferença é apenas o substituinte.

O derivado I7 mostrou maior valor de CC₅₀. Isso demonstra que esse, para promover 50% de toxicidade em células WI26VA4, necessita de dose superior, e, portanto, é o menos tóxico, quando comparado aos demais. I1, I3 e I5 apresentaram CC₅₀ semelhantes e I4 o menor valor, de acordo com teste estatístico. Em geral foi observado que o processo de síntese gerou derivados pouco tóxicos e com o uso de substituintes imina a toxicidade foi ainda menor.

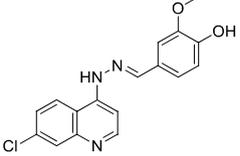
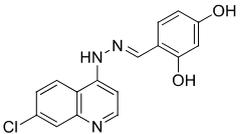
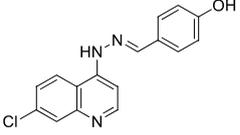
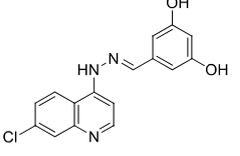
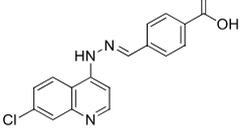
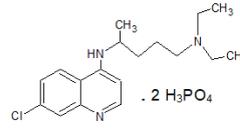
5.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPLASMODIAL *IN VITRO* ATRAVÉS DA TÉCNICA DE ELISA-HRPII

A atividade antimalárica pode ser determinada de forma indireta através da análise da proteína rica em histidina (HRPII) expressa por *P. falciparum*. Uma metodologia que pode ser empregada é o ensaio de imunoabsorção enzimático, que pesquisa pelo método de ELISA esta proteína. Dessa forma, na cultura é possível determinar o percentual de parasitos vivos, pela quantificação indireta da HRPII (NOEDL *et al.*, 2002).

A avaliação da atividade antiplasmodial *in vitro* dos derivados propostos neste estudo foi realizada por esta técnica utilizando parasitos mantidos em cultura. Foram realizados de dois a três experimentos em triplicatas e, a partir dos valores dose-resposta, foi calculado o valor de CI_{50} , por meio de curvas exponenciais obtidas pelo programa *Origin 8.0*.

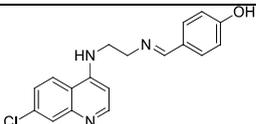
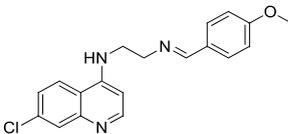
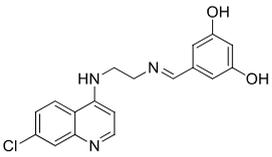
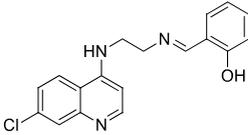
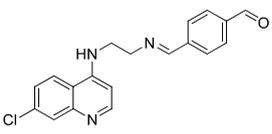
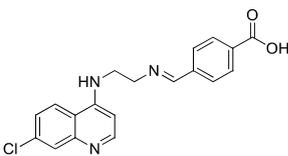
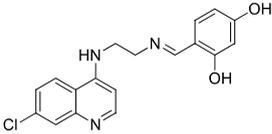
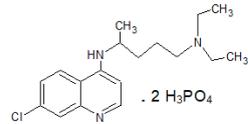
Os compostos com valores de $CI_{50} < 1 \mu\text{M}$, foram considerados ativos, entre 1 a 5 μM , parcialmente ativos e os com $CI_{50} > 5 \mu\text{M}$ foram considerados inativos (DE SOUZA *et al.*, 2014). Todos apresentados foram ativos *in vitro* contra *P. falciparum* cloroquina-resistente, em concentrações inferiores a 1 μM (tabela 9 e 10). Embora não tenha sido possível calcular o valor de CI_{50} para I2, foi observado que numa concentração inferior a 0,092 μM foi capaz de inibir o crescimento de 50% dos parasitos.

Tabela 9: Avaliação da atividade antiplasmodial *in vitro* dos derivados hibridizados com os grupos hidrazona por meio da técnica de ELISA-HRP II e cálculo do índice de seletividade (IS).

Derivados	Fórmulas estruturais	CI ₅₀ <i>P.f</i> W2 HRP II (μM)	IS (CC ₅₀ /CI ₅₀ VERO)	IS (CC ₅₀ /CI ₅₀ WI26VA4)
H1		0,235±0,007 ^{ab}	>638	45,82
H2		0,235±0,021 ^{ab}	>638	30,95
H3		0,215±0,064 ^{ab}	>697	11,25
H4		0,625 ± 0,007 ^a	>240	20,62
H5		0,335 ± 0,289 ^{ab}	>447	244,89
Cloroquina		0,053±0,0160 ^b	>2830	>365,66

Os valores de CI₅₀ foram expressos como média ± desvio padrão. As letras a e b foram utilizadas para comparação estatística entre as moléculas com substituintes hidrazonas. Diferentes letras representam diferenças estatísticas pelo teste de ANOVA, seguido de pós-teste de Tukey, nível de significância de 95%. Fonte: próprio autor.

Tabela 10: Avaliação da atividade antiplasmodial *in vitro* dos derivados hibridizados com os grupos imina, por meio da técnica de ELISA-HRP II e cálculo do índice de seletividade (IS).

Derivados	Fórmulas estruturais	CI ₅₀ <i>P.f</i> W2 HRP II (μM)	IS (CC ₅₀ /CI ₅₀ VERO)	IS (CC ₅₀ /CI ₅₀ WI26VA4)
I1		0,162±0,06 ^{ab}	>925	802,90
I2		<0,092*	Nt	>319,78
I3		0,205±106 ^{ab}	>731	386,73
I4		0,26±0,014 ^a	Nt	97,42
I5		0,160±0,011 ^{ab}	Nt	861,18
I6		0,145±0,021 ^{ab}	>1034	>194,89
I7		0,1725±0,003 ^{ab}	>869	989,62
Cloroquina		0,053±0,0160 ^b	>2830	>365,66

Os valores de CI₅₀ foram expressos como média ± desvio padrão. As letras a e b foram utilizadas para comparação estatística entre as moléculas com substituintes iminas. Diferentes letras representam diferenças estatísticas pelo teste de ANOVA, seguido de pós-teste de Tukey, nível de significância de 95%. Valores indeterminados de CI₅₀ (representados por *), não foram avaliados estatisticamente. Nt: O derivado não foi testado nesse experimento. Fonte: próprio autor.

De forma geral, os derivados do grupo imina tiveram os menores valores de CI_{50} e, portanto, os melhores resultados de atividade antiplasmodial entre as substâncias testadas. Avaliando estatisticamente os resultados de CI_{50} , todos derivados 4-aminoquinolínicos foram semelhantes à cloroquina, com exceção de H4 e I4, que apresentaram CI_{50} superiores.

Para avaliar de forma mais objetiva o potencial citotóxico e a atividade antiplasmodial dos derivados, foi realizado o cálculo do índice de seletividade (IS) (tabela 9 e 10). Essa é uma grandeza muito utilizada na literatura e permite verificar quantas vezes o composto é mais seletivo ao parasito do que às células do hospedeiro.

O IS foi calculado pela razão da concentração que reduz a viabilidade celular em 50% (CC_{50}) das células Vero e WI26VA4, sobre a atividade antiplasmodial *in vitro* expressa pelo CI_{50} contra *P. falciparum* W2. Os maiores IS foram observados quando a análise foi realizada utilizando o CC_{50} sobre as células Vero. Quando a análise foi realizada para células WI26VA4, observando IS das moléculas com substituintes hidrazonas foram comparados entre si, foi verificado que H5 foi o mais seletivo. Além disso, os demais derivados também tiveram valores de IS superiores a 10, o que significa que são ativos contra os parasitos, e não são citotóxicos aos fibroblastos humanos testados, menos ainda em relação às células Vero.

Foi observado que o grupo de moléculas com substituintes iminas teve valores de IS superiores quando comparados ao grupo com hidrazonas. O derivado I7 obteve o melhor IS determinado, o que demonstra que ele é altamente seletivo *in vitro*. I5, I3 e I4 também se destacaram pelo seu elevado IS. Apesar dos valores de IS de I2 e I6 não terem sido determinados, o resultados mostram que são elevados, e assim estas moléculas são muito seletivas.

5.7 AVALIAÇÃO DE ALTERAÇÕES NO PH DO VACUOLO DIGESTIVO DOS PARASITOS APÓS TRATAMENTO *IN VITRO*

As 4-aminoquinolinas, sobretudo a cloroquina, são compostos que sabidamente promovem alterações no pH do vacúolo digestivo do parasito e que por consequência, impedem a formação dos cristais de hemozoína, o que culmina com a morte do parasito (MUSHTAQUE e SHAHJAHAN, 2014). Diante desse conhecimento, sabendo que os derivados desse estudo são 4-aminoquinolinas e considerando ainda que estas moléculas tiveram boa atividade antimalárica *in vitro* e bons índices de seletividade, foi estudado um possível mecanismo que poderia causar a morte do parasito. Foram escolhidos os derivados I6 e I7 por apresentarem bons índices de seletividade e massa para estudos posteriores.

Com o objetivo de avaliar a influência dos derivados sobre o vacúolo digestivo, foi realizado um ensaio de colocalização em microscopia confocal, que avalia alterações de pH da organela por meio da intensidade emitida por um fluoróforo da sonda LysoSensor DND-189 (Invitrogen), fornecendo dados e imagens que comprovam as alterações que os compostos podem promover.

A sonda é capaz de adentrar o vacúolo digestivo do *Plasmodium* e, através da fluorescência emitida por ela, é possível observar na vesícula a acidez de forma proporcional. Após adição de um composto capaz de promover o aumento de pH, a acidez diminui, reduzindo assim a fluorescência emitida.

As imagens obtidas no experimento por microscopia confocal podem demonstrar os resultados de alteração de pH provocados após tratamento cultura de *P. falciparum* W2 com artesunato (controle positivo) (figura 18), I6 (figura 19) e I7 (figura 20).

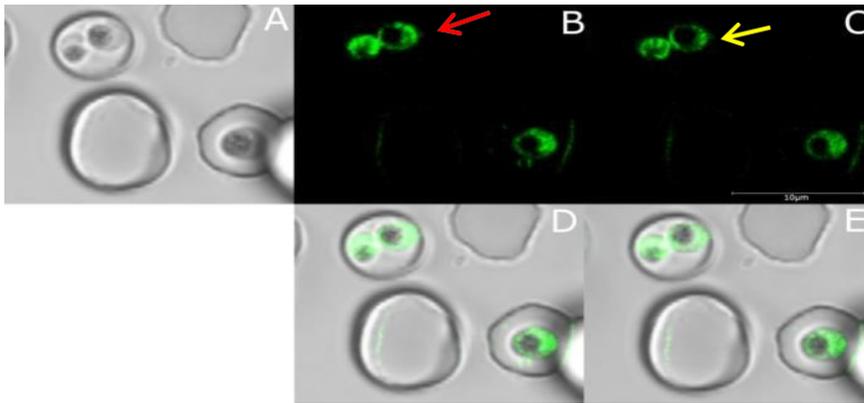


Figura 18: Microscopia confocal (objetiva 64X) para avaliação da atividade do antimalárico padrão artesunato.

A – Contraste de fase; B – Fluorescência antes da adição do composto (F0- seta vermelha); C – Fluorescência após a adição do composto (F150- seta amarela); D – Fusão das imagens antes da adição do composto; E – Fusão das imagens após adição do composto.

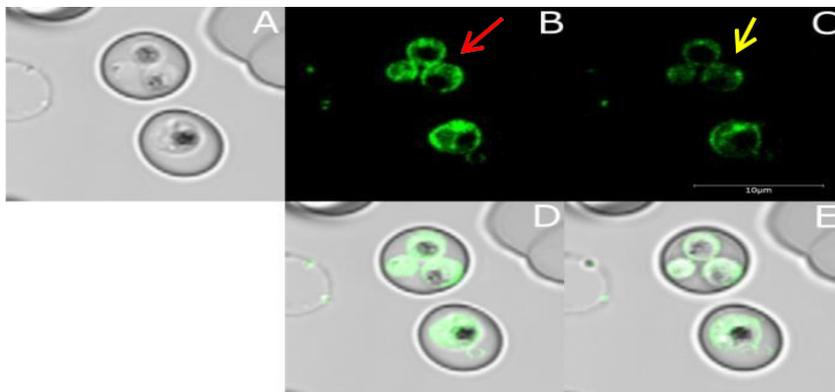


Figura 19: Microscopia confocal (objetiva 64x) para avaliação do derivado I6.

A – Contraste de fase; B – Fluorescência antes da adição do derivado (F0- seta vermelha); C – Fluorescência após a adição do derivado (F150- seta amarela); D – Fusão das imagens antes da adição do derivado; E – Fusão das imagens após a adição do derivado.

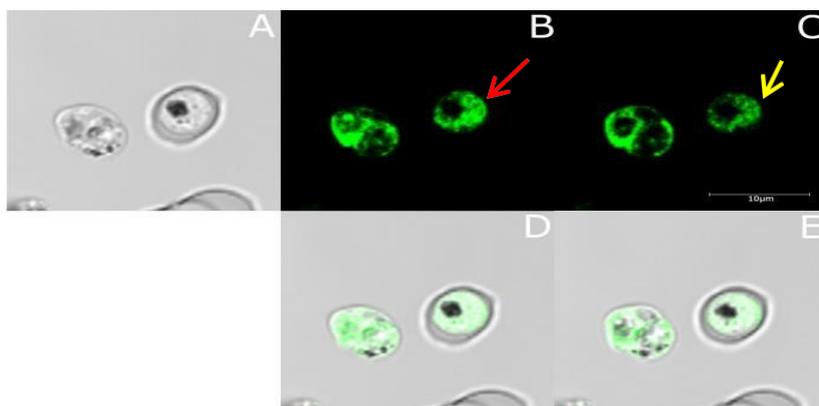


Figura 20: Microscopia confocal (objetiva 64X) para avaliação da atividade do derivado I7.

A – Contraste de fase; B – Fluorescência antes da adição do derivado (F0- seta vermelha); C – Fluorescência após a adição do derivado (F150- seta amarela); D – Fusão das imagens antes da adição do derivado; E – Fusão das imagens após a adição do derivado.

Pela captura de imagem da cultura antes e após tratamento é possível observar a redução da fluorescência após adição dos derivados, principalmente relacionada à I6. O resultado observado pode ser atribuído à atividade dos derivados sobre o vacúolo, uma vez que a partir do momento em que eles são adicionados a cultura, ocorre redução da fluorescência, indicando que podem promover a elevação de pH da organela, e assim atuando de forma semelhante ao que acontece com outras 4-aminoquinolinas (WUNDERLICH et al., 2012), e com um dos mecanismos de ação descrito ao artesunato (HONG et al., 1994).

A figura 21 representa o decaimento da média de intensidade de fluorescência emitida pelo fluoróforo, no vacúolo digestivo do parasito, desde T0 (T= 0 segundos), até T150 (T=150 segundos), para os três compostos testados nas concentrações correspondentes aos valores de IC_{50} . Os dados aqui observados confirmam numericamente o que foi mostrado nas figuras 18,19,20.

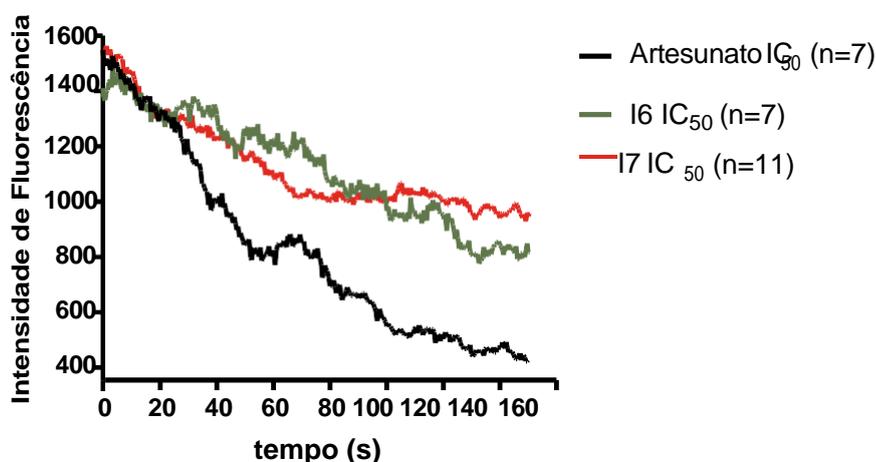


Figura 21:Decaimento da intensidade média de fluorescência (medida em UA - unidades arbitrárias) ao longo do tempo.

São apresentados os valores de intensidade de fluorescência observados ao longo do tempo após a adição dos compostos: artesunato, I6 e I7.

5.8 AVALIAÇÃO DA POTENCIAL ATIVIDADE ANTIMALÁRICA *IN VIVO* DOS DERIVADOS 4-AMINOQUINOLÍNICOS I6 E I7

Diante dos promissores resultados *in vitro* e *in silico*, foram escolhidas as moléculas I6 e I7 para dar prosseguimento aos estudos *in vivo*. Os ensaios foram realizados através do teste supressivo descrito por Peters (1965) com modificações. Após quatro horas da infecção, os animais foram tratados por gavagem com 0,1 mL de cada derivado, dos fármacos-padrão e água e DMSO. O tratamento seguiu por quatro dias consecutivos, uma vez ao dia, no mesmo horário do primeiro tratamento.

Os derivados foram diluídos em 5% DMSO em água. I7 foi testado nas concentrações de 15 mg/kg e 25 mg/kg. Devido à dificuldade de obtenção de massa, I6 foi testado somente na concentração de 15 mg/kg. Como controles positivos foram usados a cloroquina, na dose de 10mg/kg e uma solução de artesunato 5mg/kg e mefloquina 10 mg/kg. O controle negativo foi uma solução de água e 5 % de DMSO. Os valores de inibição da multiplicação do parasito são apresentados na tabela 11.

Tabela 11: Valores de inibição da multiplicação do parasito, após teste supressivo com os derivados I6 e I7.

D.p.i	CQ	ART 5 mg/kg	I6	I7	I7
	10 mg/kg	MQ 10 mg/kg	15mg/kg	15mg/kg	25mg/kg
5º	94,04%	94,9%	72,64	71,15%	93,7%
9º	41,27%	96,64%	21,67	40,13%	41,01%

Avaliação da atividade supressiva *in vivo* dos derivados I6 e I7 utilizando o modelo murino de infecção. O IMP foi calculado com base nos valores de médias de parasitemia do 5º e 9º d.p.i., obtidas pela contagem das hemácias parasitadas em esfregaço sanguíneo corado por Giemsa. D.p.i.: dias pós-infecção, CQ: cloroquina, ART: artesunato, MQ: mefloquina. Fonte: próprio autor.

De acordo com os resultados de IMP, todos os derivados tiveram importantes valores de inibição, superiores a 30%, mostrando atividade

antiplasmodial de acordo com CARVALHO e colaboradores (1991). O derivado I7 na concentração de 25mg/kg, mostrou-se mais ativo, neste teste, no 5º dia pós-infecção.

Todos derivados apresentaram menores valores de IMP no 9º d.p.i., porém I7, ainda se manteve ativo. Esta observação em relação à redução dos valores com o passar do tempo era esperada, uma vez que os animais foram tratados somente até o 4º d.p.i. No 9º d.p.i, provavelmente a concentração do composto na circulação sanguínea já teria diminuído.

De um modo geral é possível inferir que os derivados se apresentaram ativos e com maior expressão no 5º d.p.i. Com o passar dos dias e com o aumento do intervalo de tempo para a última administração dos compostos, ocorreu redução do percentual de inibição dos mesmos.

Além das parasitemias, foram obtidos dados de peso (figura 22 e 23) e sobrevivência dos animais (figura 24 e 25), executados em um experimento paralelo.

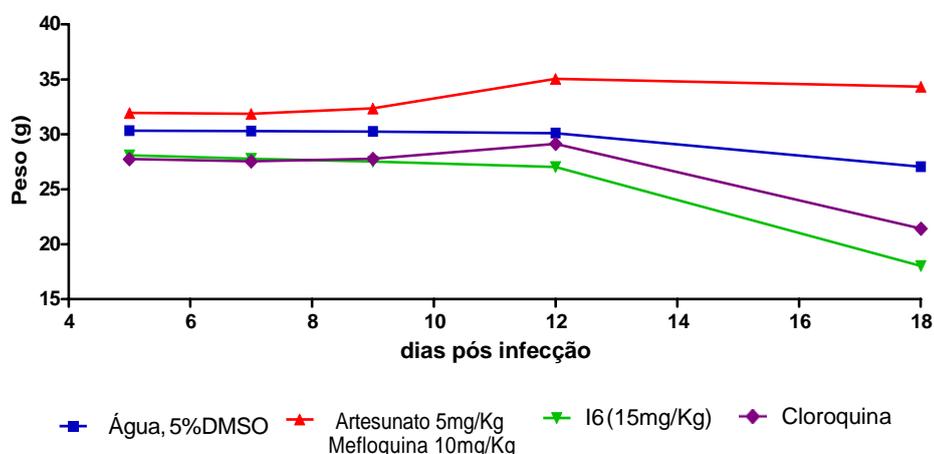


Figura 22: Análise do ganho de massa corpórea dos animais tratados com I6. Os animais foram pesados até o 18º dia pós-infecção. Fonte: próprio autor.

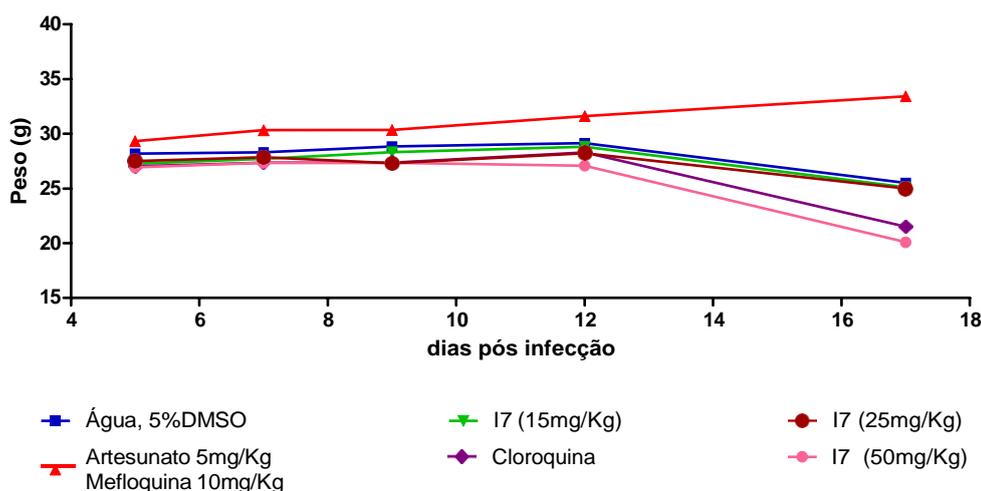


Figura 23: Análise do ganho de massa corpórea dos animais tratados com I7.

Os animais foram pesados até o 17º dia pós-infecção. Fonte: próprio autor.

No experimento *in vivo*, avaliando a influência dos derivados I6 e I7 no controle da infecção, foi possível observar pela análise estatística variações de peso ao longo dos dias entre os diferentes grupos. No 7º d.p.i, análise mostrou que o peso dos animais era semelhante e a partir do 9º d.p.i. os animais tratados com artesunato e mefloquina ganharam massa corporal.

Quando o experimento foi realizado para avaliar o tratamento com I7, o aumento de peso com artesunato foi observado no 5º d.p.i. O mesmo comportamento das curvas de peso observadas anteriormente ocorreu neste, ou seja, os animais tratados com a CQ e I7 não apresentaram progressivo aumento de peso. Os dados de peso também são importantes para verificar que o tratamento dos animais pela via oral não provocou sinais de toxicidade relacionados à redução de massa corporal, seja pela toxicidade das drogas, sejam pela execução da técnica de tratamento. Nesse caso, como as curvas não tiveram diferenças importantes, entendemos que a técnica de tratamento foi satisfatória e que os candidatos não provocaram danos à mucosa gástrica dos animais que justificassem uma perda excessiva de peso.

Avaliando a sobrevivência dos grupos comparados ao I6 (figura 24), a análise estatística mostrou que houve diferença entre as curvas e uma análise subjetiva do gráfico permite inferir que a sobrevivência do grupo I6 foi melhor do que o grupo tratado com água e DMSO. Quando a avaliação foi feita com I7 (figura 25), nas diferentes

concentrações, o teste de Mantel-Cox não revelou diferença entre as curvas. Embora os compostos tenham inibido o crescimento do parasito, não houve uma supressão completa, o que permitiu a continuidade do ciclo nos parasitos que sobreviveram ao tratamento.

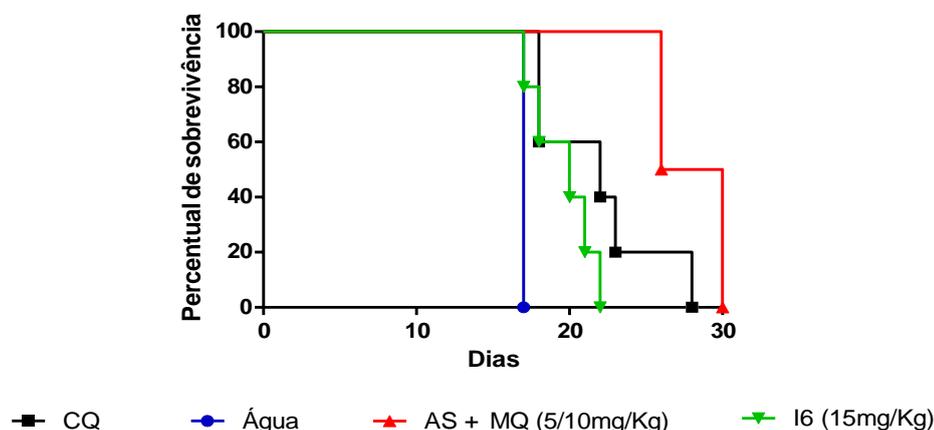


Figura 24: Análise da sobrevida em dias dos animais tratados com cloroquina, artesunato e mefloquina (AS+MQ), e I6 por 30 dias. Fonte: próprio autor.

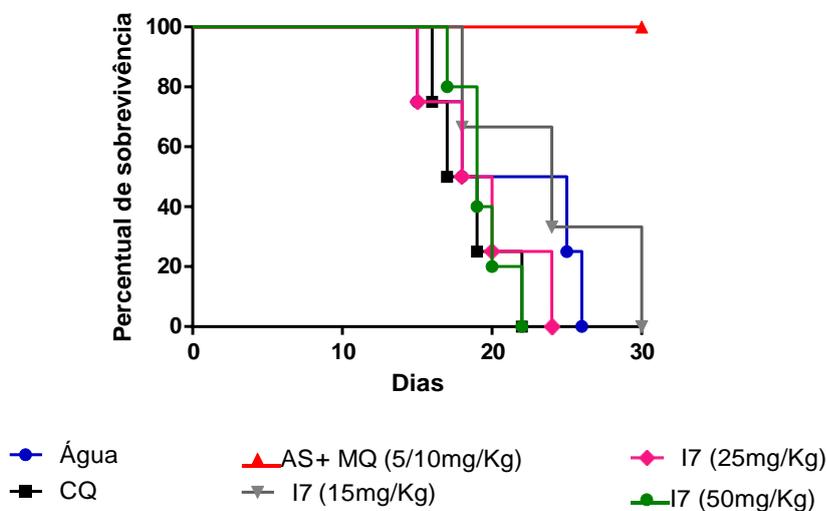


Figura 25: Análise da sobrevida em dias dos animais tratados com cloroquina, artesunato e mefloquina (AS+MQ) e I7 (15mg/kg, 25mg/kg, 50mg/kg) por 30 dias. Fonte: próprio autor.

Todos os dados *in vitro*, *in vivo* e *in silico* demonstram que a rota sintética que utiliza a hibridização com grupamentos iminas foi satisfatória, e que possui um potencial inibidor sobre o parasito, com destaque para o composto I6.

5.9 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DE BAÇO E FÍGADO DE CAMUNDONGOS TRATADOS COM OS DERIVADOS TESTADOS

A avaliação da parasitemia dos animais é a maneira mais comum de avaliar se os tratamentos estão sendo eficazes, uma vez que avalia diretamente a presença do parasito no sangue. Além desta forma, é possível verificar o processo de resolutividade da infecção através dos aspectos morfológicos e histológicos de importantes órgãos acometidos pela infecção, como o baço e fígado. Neste estudo foram avaliados cortes histológicos desses órgãos dos camundongos infectados com *P. berghei* NK65 de forma a complementar as análises de parasitemia.

No 12º d.p.i, foi coletado sangue e foram extraídos o fígado e o baço dos animais. Após análise dos esfregaços e contagem das parasitemias, foi escolhido um animal de cada grupo que apresentasse a parasitemia mais próxima a média do seu grupo. Baseado nesse critério, os órgãos foram processados de modo a obter lâminas histológicas para análises qualitativas.

Foi observado no grupo tratado com água (controle negativo) (figura 26 a) vacuolização dos hepatócitos, processo inflamatório e deposição de pigmentos de hemozoína no tecido, o que pode levar a perda da integridade do tecido. Nos grupos tratados foi possível observar que a vacuolização foi reduzida, sobretudo no tratamento com artesunato e mefloquina e com I7. O processo inflamatório, caracterizado pelo acúmulo de leucócitos, também foi reduzido com os tratamentos quando comparado ao grupo de animais infectados tratados com água e DMSO. Em relação à deposição de pigmentos de hemozoína, caracterizados por regiões marrom-avermelhadas nos cortes, foi possível verificar uma pronunciada redução, principalmente nos grupos tratados com artesunato e mefloquina, I6 e I7.

No baço (figura 27) foi possível observar no grupo tratado com água uma visível perda da delimitação entre as polpas branca e vermelha (figura 27 a), que melhor pode ser observada após os tratamentos com as drogas padrão e I6 (figura 27 d) e I7 (figura 27 e).

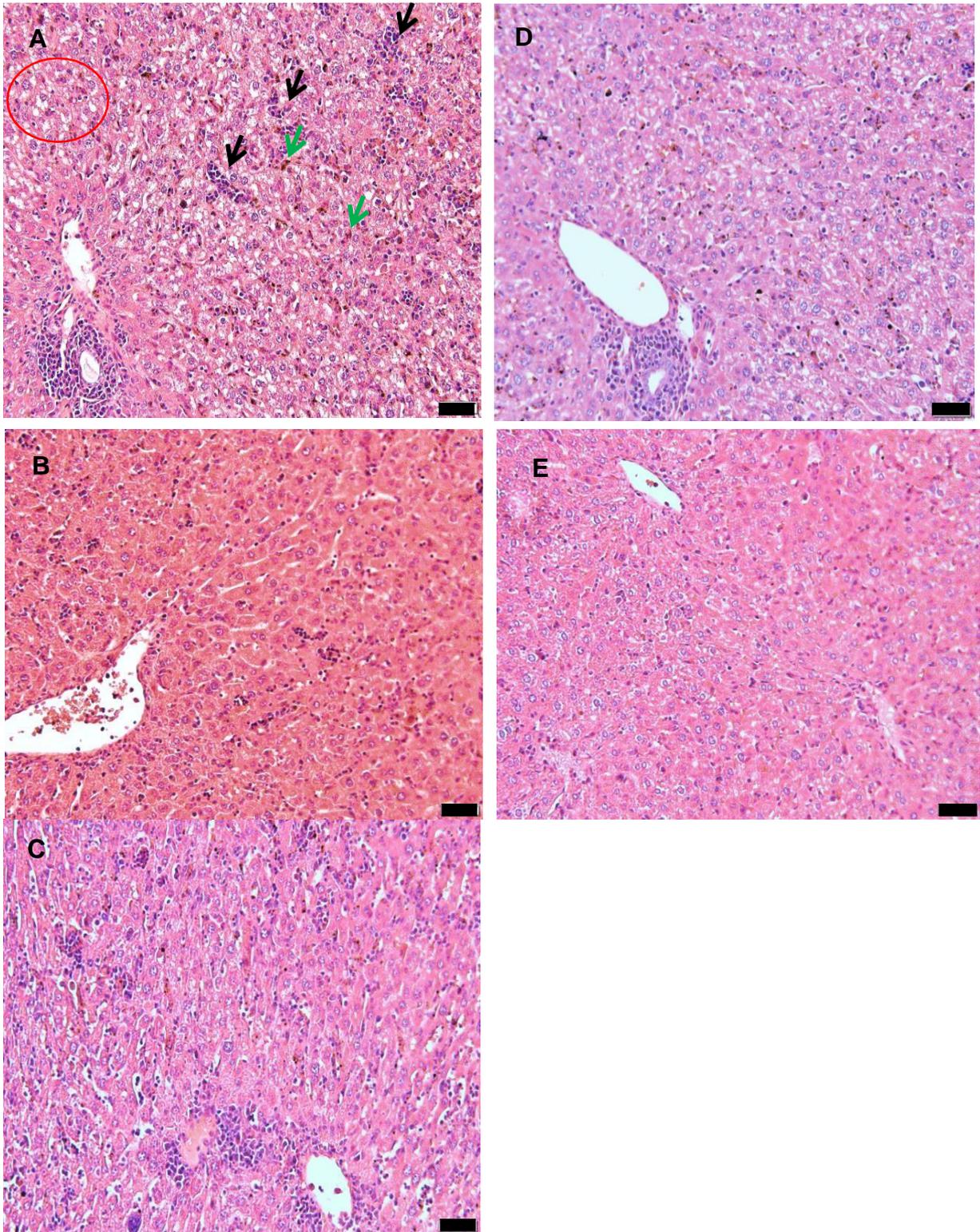


Figura 26: Alterações na morfologia do tecido hepático de animais infectados com *P. berghei* NK65, observadas com os tratamentos.

Após eutanásia o fígado foi coletado, e após processamento histológico e coloração por HE, foram obtidos cortes representativos de um animal de cada grupo tratado com água e DMSO 5% (A), cloroquina 10 mg/kg (B), artesunato 5mg/kg e mefloquina 10mg/kg (C), I6 15 mg/kg (D), I7 15 mg/kg (E). No painel A, o círculo vermelho demonstra área de vacuolização; seta de cor preta, células inflamatórias e seta verde a deposição de hemozoína. Nos grupos tratados com os fármacos e os derivados do estudo podem ser observadas reduções pontuais dessas características (asteriscos pretos) (Barra: 50 µm). Fonte: próprio autor.

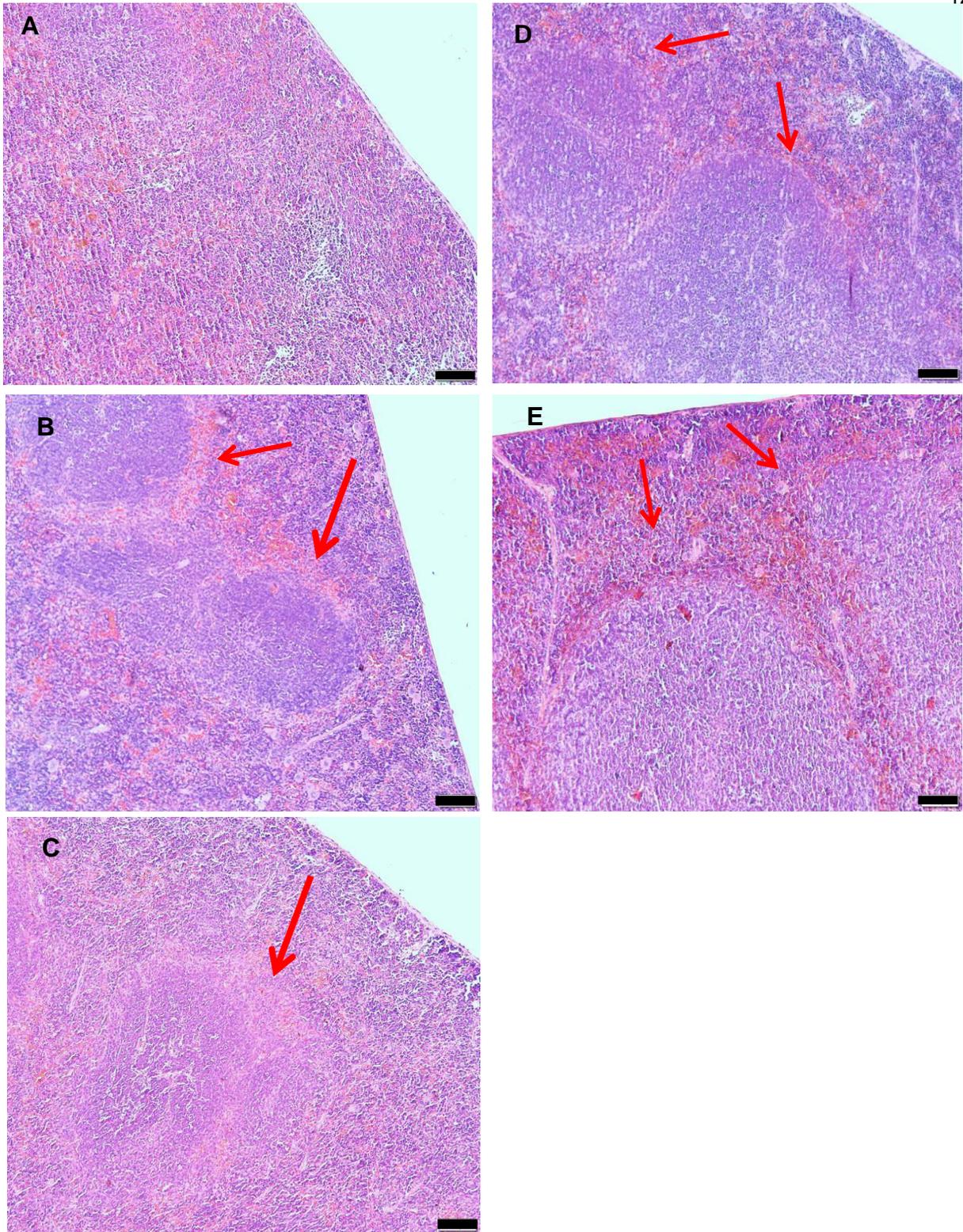


Figura 27: Alterações na morfologia do tecido esplênico de animais infectados com *P. berghei* NK65, observadas com os tratamentos.

Após eutanásia o baço foi coletado, e após processamento histológico e coloração por HE, foram obtidos cortes representativos de um animal de cada grupo tratado com água e DMSO 5% (A), cloroquina 10 mg/kg (B), artesunato 5mg/kg e mefloquina 10mg/kg (C), I6 15 mg/kg (D), I7 15 mg/kg (E). Setas vermelhas indicam a diferenciação entre a polpa branca da polpa vermelha nos animais tratados com os fármacos e os derivados. Não há separação entre as polpas no exemplar do grupo tratado com água e DMSO (Barra: 100 μ m). Fonte: próprio autor.

6 DISCUSSÃO

6.1 HIDRAZONAS E IMINAS

A quinina e seus derivados, ao longo dos anos, apresentaram-se como moléculas extremamente promissoras devido as suas diversas funções farmacológicas descritas como a atividade antimalárica, antibiótica, antituberculose, anti-HIV, antitumoral e anti-inflamatória. Isso tornou esse grupo uma importante classe terapêutica (HU et al, 2017). Apesar de muitos fármacos com o anel quinolínico já ter sido amplamente estudados, muitas questões ainda podem ser avaliadas e muitos derivados podem ser explorados cientificamente. Nesse sentido, o anel quinolínico apresenta papel central e os derivados que podem ser sintetizados a partir dele são desenvolvidos no intuito de manter ou aprimorar a atividade dessa molécula de grande importância.

Seguindo essa lógica, ao longo dos anos foram desenvolvidos fármacos para o tratamento da malária como a cloroquina, amodiaquina, mefloquina, primaquina, holofantrina, sendo que a cloroquina foi, e ainda é, o de maior sucesso terapêutico entre os demais. Com o surgimento de cepas de *Plasmodium* resistentes a CQ, tornou-se necessário a busca de novos antimaláricos eficazes contra o parasito, mas que também apresentassem baixa toxicidade e baixo custo. (GELBAND et al., 2004).

Dentre os derivados, primaquina e mefloquina ainda são utilizados em terapia combinada a outros fármacos, porém, nenhum deles apresenta as mesmas propriedades e vantagens como as que a cloroquina obteve antes do advento de linhagens resistentes (MUSHTAQUE; SHAHJAHAN, 2014). O desenvolvimento de novas drogas antimaláricas é interessante quando outros grupos químicos com propriedades farmacológicas são agregados ao anel quinolínico por hibridização (SALAHUDDIN et al. 2013, FORTIN; BÉRUBÉ, 2013; KERRU et al., 2017, HU et al,

2017, MANOHAR et al, 2012). Alguns estudos de química medicinal têm sido reportados utilizando técnicas que permitem a modificação da cadeia lateral do grupo 7-cloro-4-aminoquinolina com o objetivo de manter a atividade antimalárica pela técnica de hibridização (SOLOMON et al., 2007; SALAHUDDIN et al. 2013).

Diante disso, foram apresentadas nesse trabalho duas séries de novos derivados, obtidas por esta técnica de hibridização. Além do grupo farmacofórico principal, o anel 4-aminoquinolinínico, foram agregados diversos compostos aromáticos, usando como substituinte uma estrutura química formada por dois grupos que já mostraram atividade contra diversos microrganismos: as hidrazonas (ROLLAS e KÜÇÜKGÜZEL, 2007; SHARMA et al., 2014) e as iminas (SHI et al. 2007; THUY et al. 2012; MURTAZA et al., 2014; CERUSO et al. 2015).

Demonstrando a importância desses grupamentos, Gemma e colaboradores (2006) apresentaram uma série de dez compostos cujo grupamento substituinte era uma hidrazona hibridizada a diversos grupamentos químicos. Os derivados mostraram atividade antiplasmodial *in vitro*, sobretudo em linhagens resistentes de plasmódios. Devido às características químicas das substâncias, o mecanismo de ação provável seria a interação com a hematina, possibilitando a geração de radicais tóxicos capazes de interferir na homeostasia do parasito.

Sarkar e colaboradores (2016) também propuseram uma nova classe de pequenas moléculas que denominaram de hidrazonas benzotiazólicas. Verificaram que esses compostos possuíam atividade antiplasmodial, sendo que um deles mostrou atividade antimalárica *in vivo*. Sharma e colaboradores (2014) propuseram a síntese de novos derivados de hidrazonas 4 aminoquinolinícos 9-aniloacridinil, que tiveram sucesso no controle *in vitro* de *P. falciparum* cepa K1 (cloroquina-resistente), com bons índices de seletividade. No trabalho foram obtido bons resultados de citotoxicidade em células Vero e os ensaios *in vitro* demonstraram que estes compostos poderiam inibir a formação da β -hematina.

Outra classe química que tem sido bastante estudada é a imina, também conhecida como base de Schiff, que ao longo dos anos tem revelado ser bastante promissora contra diversos agentes infecciosos (SHI et al. 2007). Thuy e colaboradores (2012) desenvolveram uma série derivados de quinililhidrazonas e hidrazonas contendo bases de Schiff e verificaram atividades promissoras *in vitro*, sobretudo quando hidroxilas (OH) e bases de Schiff estão presentes.

Neste trabalho foi proposta a avaliação da atividade biológica contra malária de duas novas classes de derivados 4-aminoquinolínicos sintéticos: a primeira composta de 5 moléculas, cujo substituinte era uma hidrazona (grupo H) e a segunda série formada de 7 moléculas, com o substituinte imina (grupo I).

6.2 ANÁLISES *IN SILICO*

O processo de hibridização molecular, apesar de ser muito promissor para descoberta de novos fármacos, pode gerar moléculas com elevado peso molecular e que podem apresentar problemas de biodisponibilidade na administração pela via oral. Isso pode ser entendido por meio da violação às regras de Lipinski, estas que têm sido muito utilizadas pelas indústrias farmacêuticas no processo de desenvolvimento de novos medicamentos (NQORO et al. , 2017). Para que haja uma biodisponibilidade satisfatória de um composto é necessário o equilíbrio entre solubilidade e permeabilidade, o que está associado às grandezas como valores de log P, peso molecular e doadores e aceptores de hidrogênio (MUEGGE, 2003), parâmetros avaliados pela regra de 5 de Lipinski. Uma reduzida permeação ou absorção está relacionada a compostos que possuem mais que 5 doadores e 10 aceptores de hidrogênio, $\log p > 5$ e massa molecular maior que 500 g/mol.

A avaliação da regra dos 5 de Lipinski pode ser realizada *in silico*, ou seja, através da utilização de modelos computacionais que permitem uma estimativa de solubilidade e permeabilidade das drogas, por meio da análise da adequação às regras (LIPINSKI et al., 1997). Apesar da existência de fármacos no mercado que não atendam as regras, estas recomendações ainda têm sido muito utilizadas para o desenvolvimento de novas moléculas com atividade biológica (GASPAR; MOTA, 2015).

Diante da necessidade de entender o comportamento dos compostos neste estudo, em relação às características acima descritas, foi feita uma análise das propriedades físico-químicas utilizando ferramentas computacionais. Outros

trabalhos que também avaliavam derivados quinolínicos verificaram o atendimento as normas de Lipinski (MAURYA et al, 2017). No presente estudo, os derivados H2, H3, H5 tiveram violação em relação ao coeficiente de partição, indicando maior lipofilicidade dos compostos. Nenhum representante do grupo I violou os parâmetros avaliados, segundo a regra, apresentando boa biodisponibilidade para administração pela via oral.

Uma possível explicação para violação da regra, seria a adição de grupos de grande volume na cadeia lateral (KASHYAP et al. 2016), porém isso só foi observado para alguns compostos (H2, H3 e H5). Medicamentos atualmente disponíveis também apresentam violações. Como exemplo o Itraconazol, possui $\log P = 5,53$, massa molecular = 705,65 e números de aceptores igual a 12. Assim, apesar deste ser um fármaco que não se adequa as regras, é usado na terapêutica atual. Outros exemplos de fármacos que violam as regras: ciclosporina, doxorrubicina, eritromicina e azitromicina (LIPINSKI et al., 1997).

Apesar de H2, H3 e H5 apresentarem valores de $\log P$ superior a cinco, seus valores ficaram pouco acima do limite, e ainda, estes são relacionados à forma bruta da substância e talvez a preparação de uma formulação adequada pudesse ajudar na questão de solubilidade (GUEDES, 2008). Embora existam várias abordagens que ajudem a estimar a solubilidade e permeabilidade de candidatos a fármacos, não existe um método preciso, apesar da regra dos 5 fornecer boas informações para a síntese de novas moléculas, quando se tem um grande número de compostos disponíveis, como na triagem biológica automatizada de larga escala (LIPINSKI et al. 1997).

Além das propriedades físico-químicas, as propriedades farmacocinéticas são de grande importância para a observação da ação farmacológica. Apesar de importante, os custos experimentais desta etapa são bastante elevados. Assim, técnicas computacionais foram desenvolvidas para estudar o comportamento farmacocinético de novos candidatos a fármacos, fornecendo previsões sobre as propriedades ADMET (absorção, distribuição, metabolismo, excreção, toxicidade) e auxiliando no entendimento a respeito da viabilidade ou não destes candidatos para testes mais laboriosos (CHENG, et al., 2012).

Neste trabalho, a plataforma *online* AdmetSar 1.0 foi usada para prever alguns desses parâmetros farmacocinéticos. Candidatos com problemas em relação às propriedades ADMET provavelmente terão dificuldades relativas a farmacocinética e ligação no sítio de ação e, ainda, é possível apresentar toxicidade (MODA, 2011). A predição realizada neste estudo, mostrou que todos candidatos apresentaram, *in silico*, boa permeabilidade na barreira hematoencefálica e no intestino humano, indicando que possuem lipofilicidade, assim como demonstrado pelo cálculo de log P.

Uma das formas de avaliação de permeabilidade de fármacos *in vitro* é o uso de cultura de células Caco-2 (adenocarcinoma de colón humano) (PENG, 2018). Dentre as informações que são fornecidas pelo programa AdmetSar *in silico*, está o possível comportamento da molécula nessa cultura. Na análise *in silico* foi observado que todas as hidrazonas eram permeáveis, porém, em relação às iminas, isso ocorria somente para I5.

A aplicação de culturas de células Caco-2 é usual para avaliação de permeabilidade de fármacos devido à sua correlação com as células intestinais humanas, porém esse modelo de estudo apresenta variações. As células Caco-2 possuem menor porosidade do que as células humanas e podem apresentar alterações em relação aos transportadores (FREDLUND et al., 2017; LARREGIEU e BENT, 2013). De modo contrário, existem resultados de drogas com permeabilidade em células Caco-2, que não correspondem à absorção no intestino humano (LARREGIEU e BENT, 2013). Em suma, podemos entender que, de forma geral, os derivados estudados possuem boa capacidade de permear as células humanas, porém testes *in vitro* para verificação dos resultados dessa predição são necessários.

Os efeitos adversos dos fármacos e a interação entre drogas são bastante comuns e muitos casos envolvem interações com o complexo de enzimas do citocromo P450. Estas interações podem ser por indução ou inibição enzimática, e as substâncias podem atuar como substratos, inibidores ou indutores (BIBI, 2008).

A atuação de substâncias como inibidoras do citocromo P450 pode levar a interações medicamentosas resultantes das variadas concentrações dos fármacos no alvo de ação e fora dele, e ainda, o atraso na metabolização de outras

substâncias. Estas questões devem ser avaliadas de forma preventiva durante o desenvolvimento de um novo candidato a fármaco (RAUNIO et al., 2015).

A análise do programa AdmetSar também forneceu dados em relação ao metabolismo preditivo por sete enzimas do citocromo P450: CYP450 2C9, CYP 450 2D6, CYP450 3A4, CYP450 1A2, CYP4502C9, CYP450 2D6, CYP450 2C19, CYP450 3A4.

Os derivados H1 e I2 foram classificados como substrato para CYP450 3A4, sendo esta uma enzima envolvida no processo de metabolização de mais da metade dos medicamentos atualmente disponíveis, seguida do subtipo 2C9 (DE SOUSA e BERNKOP-SCHUNURCH, 2014). Todas as moléculas estudadas aparentemente são capazes de inibir a CYP1A2 que é expressa principalmente no fígado. Isso leva a sugerir que estes poderiam atuar no processo metabólico de modo similar a fármacos como o omeprazol (HAN et al. , 2002) que é inibidor dessa enzima. H1 e I2 possivelmente poderão ser metabolizados pela CYP 3A4. A literatura mostra que mais de 50% dos fármacos são metabolizados por esta CYP (ZHOU, 2008). Alguns fármacos, como a rifampicina e fenitoína, atuam como indutores dessa enzima; outros como a claritromicina, eritromicina, ritonavir, fluoxetina, fluvoxamina atuam como inibidores dessa enzima. Nesses casos, e durante uma possível co-administração de várias dessas substâncias com compostos sabidamente indutores ou inibidores, os riscos de interações medicamentosas deverão ser avaliados evitando o surgimento de quadros tóxicos ou mesmo letais (ZHOU, 2008).

A CYP 2C9, tem como substrato a varfarina e alguns anti-inflamatórios não estereoidais, fenitoína e losartan (BIBI et al., 2008). Nesse caso a possibilidade de interação medicamentosa com H1, H2, H4, e H5 devem ser analisadas, já que os resultados predizem que estes são possíveis indutores dessa enzima.

Pelos resultados *in silico*, a CYP 2C 19 é inibida por quatro representantes do grupo H: H1, H2, H3 e H4 e o derivado I2. Esta enzima tem como substratos conhecidos a amitriptilina, omeprazol, lansoprazol e pantoprazol (ZANGER et al., 2013; BIBI et al., 2008). Então, o uso concomitante das substâncias poderia prejudicar a metabolização levando a possíveis reações adversas ao uso dos medicamentos.

Todos os derivados, exceto H5 e I6, podem atuar como inibidores da CYP2D6. Esta enzima é capaz de metabolizar vários fármacos, como antiarrítmicos, antidepressivos tricíclicos, betabloqueadores (BIBI, 2008). Diante disso, é necessário observar quais seriam os efeitos da administração concomitante desses candidatos à fármacos preditivamente inibidores desse estudo, com os fármacos metabolizados por esta enzima. O derivado I6 foi o único a apresentar baixa promiscuidade inibitória para CYP450, os demais são capazes de interagir com muitas proteínas da CYP450. Por esta análise preditiva, I6 seria o derivado que apresentaria menos interações com as enzimas do citocromo P450, que são importantes para o metabolismo de xenobióticos.

Além das análises *in silico* aqui apresentadas, outras são necessárias para prever o comportamento dessas substâncias em relação a processos farmacocinéticos. Por exemplo, a interação com outras enzimas como aldeído oxidases, xantina oxidases, monoamino oxidases (LIN et al., 2003), com a glicoproteína-P, interações no transporte renal de substâncias, entre outros. Outros aspectos devem ser avaliados, como a existência de um metabolismo pré-sistêmico que ocorre em grande medida no intestino por enzimas dos citocromos P450 (CYP450), transferases, peptidases e proteases. Assim, é necessário um vasto estudo sobre a absorção, metabolismo e excreção envolvendo diversas etapas da farmacocinética (DE SOUSA e BERNKOP-SCHUNURCH, 2014).

Em relação aos parâmetros de toxicidade, um teste muito utilizado para avaliar a genotoxicidade *in vitro*, o teste de AMES, que avalia a capacidade de reversão de um processo de mutação em *Salmonella typhimurium*. No ensaio são usadas bactérias que apresentem mutações, que as impossibilitam de sintetizar o aminoácido histidina. Durante o teste, após entrar em contato com um xenobiótico mutagênico, a função de síntese pode ser restaurada permitindo o crescimento da bactéria e a formação de colônias. Nesse estudo, a avaliação mostrou que três derivados não são tóxicos conforme este parâmetro são eles: H2, H5 e I6. Todos demais podem levar a genotoxicidade, de acordo com o teste.

O teste de AMES tem correlação positiva com diversas substâncias carcinogênicas que interagem com o DNA, porém, resultados negativos não o isentam de carcinogenicidade, nem determinam a potência que isso ocorre. Ademais, o teste de AMES identifica compostos com potencial para realizar o

primeiro passo da carcinogênese, mas não avalia demais etapas que levam a esse processo (BENIGNI e BOSSA, 2011). Nenhum derivado do presente trabalho apresentou *in silico* potencial carcinogênico.

A toxicidade oral aguda é outro importante dado a ser analisado durante o desenvolvimento de fármacos, porém é difícil obtenção de resultados experimentais, sendo então, a avaliação *in silico*, uma boa alternativa para determinar este parâmetro (LI et al. 2014). Assim, foi avaliada toxicidade oral aguda, classificando os compostos de acordo com as regras da EPA - *U.S. Environmental Protection Agency* (2012) pelo programa AdmetSar. Todos do presente estudo foram categorizados no nível III, ou seja, teriam DL_{50} (dose letal para 50% dos animais testados) entre 500 e 5000 mg/kg. Estas dosagens são muito superiores àquelas encontradas na literatura para o tratamento da malária (SOARES et al., 2015). Conforme Katsuno (2015), um antimalárico ideal poderia ter uma dosagem efetiva máxima de 50mg/kg. Neste estudo, a dosagem máxima avaliada foi de 25 mg/kg, no estudo *in vivo*.

Na triagem de novos fármacos uma abordagem que pode ser explorada *in silico* é a busca de possíveis alvos de ação das moléculas estudadas, sendo assim foi realizada a verificação da afinidade dos derivados pela enzima lactato desidrogenase plasmodial (pLDH) através de estudos de *docking* molecular. O ensaio foi realizado utilizando o software Autodock Vina e o molde para construção da enzima PfLDH foi obtido pelo *Protein Data Bank* (PDB).

Foram obtidos valores de afinidade (kcal/mol), resíduos de interação na proteína e cKi (μ M) para todos os derivados estudados e fármacos padrão. O cKi é a constante de inibição que representa a quantidade de fármaco que é necessária para inibir uma enzima. Valores elevados de cKi mostram que é preciso uma grande concentração da substância para interagir com o sítio da enzima e, assim, podendo gerar toxicidade. Dessa forma, os menores valores de cKi são mais interessantes, como observados para H1, I4, I6 e I7.

Em relação à forma de interação para que substratos se liguem à enzima é necessário que o resíduo catalítico His182 esteja protonado (SHOEMARK, 2007). Para que a protonação possa ocorrer é necessário que uma reação com Asp155, que desempenha um papel na modulação do valor de pKa da His182, formando então uma díade catalítica. Asp155 interage com His182 estabelecendo uma forma

protonada do anel imidazólico de His 182 por meio de uma ligação de hidrogênio. A catálise enzimática envolve uma reação de transferência de hidreto na qual o estado de transição é estabilizado pela Arg 95 (ativa a His182 e estabiliza o estado de transição). Outro resíduo catalítico, a Arg 158 (se liga e orienta o substrato), é responsável por fixar o substrato através de duas fortes interações entre sua cadeia lateral e o grupo carboxilato do piruvato (OLIVEIRA, 2011).

Para a mefloquina, H1, I4, I6 e I7, além dos valores satisfatórios de energia que sugerem que a interação entre os derivados e o alvo ocorre de forma espontânea, os valores de cKi reafirmam essa afinidade. Os demais derivados tiveram interação com o resíduo catalítico His182, com exceção de H3. O derivado I1 interagiu com todos os resíduos considerados importantes.

É possível observar que entre os fármacos padrão, a mefloquina obteve o melhor resultado, tanto pela afinidade quanto pelo cKi apresentado, corroborando dados da literatura que mostram a ação dessa substância na enzima (TEGAR e PRUNOMO, 2013). Observando a disposição molecular é possível verificar que a maior interação com os resíduos acontece pelo anel heterocíclico da mefloquina, mais do que o anel 4-aminoquinilínico. Para os derivados 4-aminoquinolínicos deste estudo o mesmo comportamento espacial foi observado, sugerindo uma forma de ação semelhante a da mefloquina, quando a enzima pLDH é analisada.

Sabe-se também que a cloroquina e a mefloquina são inibidores competitivos da enzima e pelos valores de cKi dos derivados temos indícios que estes também poderiam ser inibidores, porém isso precisa ser melhor investigado.

Em geral os ensaios *in silico* forneceram parâmetros importantes para o entendimento do comportamento dessas moléculas como candidatos à fármacos, porém ensaios *in vitro* e *in vivo* são necessários para completar e validar informações importantes para o entendimento dessas moléculas na terapia contra malária.

6.3 ANÁLISE DOS ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE

Diante dos promissores ensaios *in silico* foram realizados testes de citotoxicidade, que são os primeiros ensaios *in vitro* a serem executados, durante a triagem de novos candidatos à fármacos. Sendo assim, o primeiro ensaio realizado neste estudo foi a avaliação da capacidade hemolítica dos compostos em diversas concentrações, até o valor máximo de 150 μM .

Os testes de citotoxicidade são estudos indicados pelas agencias fiscalizadoras como a ANVISA na triagem de diversas moléculas, com o objetivo de avaliar se candidatos à fármacos podem ser prejudiciais às células-alvo. Estes testes possuem grande relevância em relação a custo benefício, e ajudam a eliminar gastos desnecessários com o estudo de novos fármacos (NOGUEIRA e ROSARIO, 2010).

O uso de hemácias humanas em ensaios de citotoxicidade *in vitro* pode ser muito útil, principalmente no modelo de infecção por malária, uma vez que estas são as célula-alvo dos compostos antimaláricos. Dessa forma, o teste de citotoxicidade, também conhecido como teste de hemólise, é uma boa triagem inicial para verificar se as moléculas lisam as hemácias de forma generalizada, o que não seria o objetivo do tratamento, uma vez que se busca compostos que possam agir especificamente sobre o parasito. Além disso, um alto percentual de hemólise pode piorar os quadros de anemia observados na malária.

Um composto sendo hemolítico, quando adicionado a uma solução de hemácias, promove o rompimento da membrana celular e o conteúdo da hemoglobina liberado pode ser quantificado colorimetricamente com a utilização de um espectrofotômetro. Para fins de análise é usada como parâmetro de comparação entre os compostos, a hemólise provocada por um composto sabidamente hemolítico, como a saponina, considerando-a 100% hemolítica. Segundo Pagano e Faggio (2015), compostos com taxas de hemólise entre 0 e 9% não são considerados hemolíticos, entre 10 a 49% são considerados levemente tóxicos, de 50 a 89%, tóxicos e entre 90 a 100%, muito tóxicos. Todos os derivados testados, tanto da classe de hidrazonas, quanto de iminas, tiveram os valores de hemólise inferiores a 10%, e, portanto, não foram considerados tóxicos. Resultados

semelhantes relacionados à citotoxicidade foram obtidos por Salahuddin e colaboradores (2013) que ao testar compostos híbridos em hemácias humanas mostraram que os valores de hemólise na concentração de 100 μM foram inferiores a 10 %.

Além do ensaio de hemólise outros testes podem ser realizados para avaliar a citotoxicidade *in vitro* dos derivados deste estudo avaliados. Em geral, nestes testes as células em cultura são expostas às substâncias avaliadas em diferentes concentrações e, a partir daí, é possível observar a viabilidade celular após a exposição.

Diversos tipos de células podem ser utilizados para avaliação da citotoxicidade, como as células imortalizadas: HeLa (derivada de câncer cervical humano) (MORADHASELI et al. 2013), HepG2 (células de hepatoma humano) (AGUIAR et al. 2015), VERO (células epiteliais de rim de macaco verde africano) (SHARMA et al., 2014; MANOHAR et al., 2012), BGM (*Bufallo Green Monkey*) (CROCI et al. 1997), WI26VA4 (fibroblasto de pulmão humano não canceroso) (NUNES et al. 2016) e também as células de culturas primárias, como macrófagos peritoneais de camundongos (ANTINARELLI et al., 2016).

Neste trabalho foi usado o ensaio colorimétrico de MTT para avaliar a viabilidade das células Vero e WI26VA4 após adição dos derivados 4-aminoquinolínicos. As células Vero foram cultivadas em meio RPMI e, após adição das amostras testes na concentração máxima de 150 μM e incubação, não foram observados sinais de citotoxicidade para nenhuma das substâncias avaliadas, tanto do grupo de hidrazonas, quanto de iminas.

Sharma e colaboradores (2014), avaliando também derivados 4-aminoquinolínicos e que possuíam hidrazonas e bases de Schiff em sua estrutura, verificaram baixa toxicidade, semelhante aos resultados encontrados nesse estudo. Manohar e colaboradores (2012) desenvolveram uma série promissora de híbridos 4-aminoquinolinas com pirimidinas, e verificaram que maioria não foi tóxica até a concentração de 60 μM e os valores de CC_{50} determinados ficaram entre 8,8 a 49,4 μM . Manohar et al. (2013) mostraram que derivados de 7-cloro 4-aminoquinolinas-triazina não foram citotóxicos, em sua maioria, até a concentração de 25 μM .

Uma terceira análise de citotoxicidade foi realizada em células imortalizadas humanas, as células WI26VA4. Foi verificado de forma geral que todos os derivados foram pouco tóxicos, principalmente quando observados seus valores de índice de seletividade.

Outros estudos avaliando a citotoxicidade nesse grupo celular encontraram valores de CC_{50} semelhantes ao deste trabalho. BARBOSA et al. (2017), avaliando novos candidatos a antimaláricos de análogos de alcaloides 3-alquilpiridínicos, obteve valores de CC_{50} superiores a 6,4 μ M.

Os diferentes resultados de citotoxicidade entre as células Vero e WI26VA4 podem ser esperados visto que estas células são de origem diferente e podem apresentar resultados variados quando são submetidas a um mesmo estímulo (RAMOS-SILVA et al.; 2017, LEARY et. al.; 2002; SENTHILRAJA e KATHIRESAN, 2015). Todos resultados de citotoxicidade abordados demonstram que a rota sintética utilizada para o desenvolvimento das moléculas híbridas, partindo de um grupo farmacofórico quinolínico, utilizando substituintes que possuem atividade biológica descrita, não gerou produtos tóxicos para as células testadas, permitindo assim a continuidade dos estudos.

6.4 ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIPLASMODIAL *IN VITRO*

Após a verificação da citotoxicidade, foi avaliada *in vitro* a potencial atividade antiplasmodial dos candidatos à fármacos. Para alcançar este objetivo foi estabelecida a cultura de *P. falciparum*, nas condições propostas por TRAGER e JANSEN (1976), com modificações. A partir dessa cultura foram preparadas microplacas onde foram adicionados os compostos em diferentes concentrações. A análise da atividade antiplasmodial foi executada através da técnica proposta por NOEDL et al. (2002), onde se detecta, pelo ensaio de imunoabsorção enzimática, a proteína HRPII de *P. falciparum*, após o tratamento, quantificando de forma indireta os parasitos viáveis.

Todos os derivados deste estudo foram considerados ativos, uma vez que atingiram valores de CI_{50} inferiores a 1 μM , de acordo com De Souza e colaboradores (2014). O composto com maior potencial de inibição observado foi o I2.

Mahmoudi e colaboradores (2006) consideram compostos com CI_{50} inferiores a 10 μm com atividade antimalárica, mas como forma de otimizar os processos de triagem de fármacos, reduzindo o número de casos falso positivos, foram considerados como inativos os que tiveram atividade superior a 5 μM . Corroborando os valores aceitáveis de atividade, Manohar e colaboradores (2013) mostraram que as moléculas mais ativas possuíam valores de CI_{50} entre 0,11 e 0,42 μM , superiores ao da cloroquina, e que no intervalo de 0,48 a 0,49 μM eram semelhante a cloroquina, para uma cepa *P. falciparum* clone W2. Barbosa e colaboradores (2017) consideram como moderadamente ativas moléculas com valores de CI_{50} entre 8,9 a 210,6 μM . O valor de CI_{50} da CQ, neste trabalho, apresentou-se superior ao da maioria dos CI_{50} obtidos pelos derivados propostos, porém o potencial mecanismo de ação sobre a pLDH, obtido de todos os compostos (exceto H3), e sobre o vacúolo digestivo para I6 e I7, sugere que são moléculas promissoras para o desenvolvimento de novos antimaláricos, e seu uso combinado com outros compostos pode ser uma alternativa para melhoria da terapia (PENNA-COUTINHO et al., 2011).

No estudo da quimioterapia é comum avaliar o índice de seletividade (IS), como parâmetro de eficácia de uma substância. Este quantifica de maneira simples o quanto ela é mais seletiva ao parasito do que tóxica a uma cultura de células humanas. Foram assim calculados os IS de todos os candidatos e observado que as moléculas do grupo hidrazona tiveram valores de IS entre 11,25 a 244,89, e as do grupo imina superiores a 97,42. Estes achados demonstram o potencial de todas as substâncias testadas, uma vez que tiveram atuação seletiva sobre os parasitos. Katsuno e colaboradores (2015) propuseram que compostos químicos que possuem valores de CI_{50} inferiores a 1 μM em cepas resistentes de *P.falciparum*, e índice de seletividade maior que 10, quando a citotoxicidade foi avaliada em células de mamífero, poderiam ser considerados “*Hit compound*”, ou seja, compostos antimaláricos promissores. Desta forma, com base nesses parâmetros preliminares os compostos deste estudo se enquadram nesses requisitos. Outras características

relacionadas a um composto que poderia ser considerado promissor seriam: estrutura química identificada, pureza elevada, atividade *in vitro*, conhecimentos preliminares sobre a sua relação estrutura atividade, conformidade com a regra dos cinco de Lipinski e síntese com no máximo cinco passos (KATSUNO *et al.*, 2015), requisitos esses, que já foram explorados nesse estudo e devem ser mais bem investigados.

Entidades químicas que contêm grupamentos hidrazona, como os pertencentes ao grupo químico H, já foram analisadas em outros estudos que também observaram atividade contra plasmódios *in vitro* (DOS SANTOS FILHO *et al.*, 2016; MELNYK *et al.*, 2006). Isso comprova que a hibridização com o grupamento hidrazona mantém a atividade antimalárica do grupo farmacofórico básico. A hibridização é uma técnica de sucesso. Manohar e colaboradores (2013) sintetizaram uma série de 28 híbridos de triazinas conjugadas com 4-aminoquinolinas, com resultados de CI_{50} entre 0,06 μM a 0,67 μM contra *P. falciparum* D6 (cepa cloroquina-sensível), e 0,11 μM a 2,06 μM contra *P. falciparum* W2 (cloroquina-resistente). Os autores descreveram que o espaçador que une o anel 4-aminoquinolinico a 1,3,5 triazina(n), tem um papel importante para a atividade de suas moléculas, e que à medida que esse substituinte aumenta é observada melhora do resultado contra o parasito. O aumento do índice de seletividade observado foi relacionado à substituição aromática na 1,3,5 triazina, e não uma substituição alifática, o que poderia contribuir para o caráter lipofílico associado aos grupos aromáticos.

Manohar e colaboradores (2014) revisaram estudos sobre hibridização relacionados à estrutura-atividade de 4-aminoquinolinas e descreveram que o grupamento 7-cloro-4-aminoquinolínico é essencial para a atividade antiplasmodial, e substituições no anel não favorecem a atividade do mesmo. Outra porção importante seria a cadeia 4-amino lateral, que deve conter de 2 a 8 carbonos o que levaria ao aumento da sua atividade, e, ainda, poderia melhorar com a adição de grupos volumosos (figura 28). Substituições no grupamento 7-cloro não se mostraram interessantes, pois pode ocorrer redução da atividade, mostrando a importância da ligação do cloro ao anel.

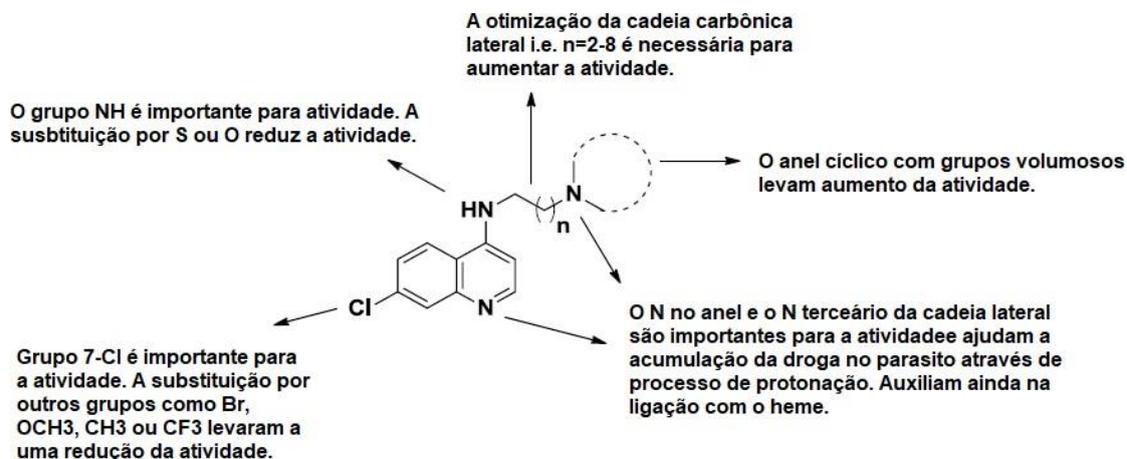


Figura 28: Relação estrutura-atividade dos compostos 4-aminoquinolínicos.

Adaptado de MANOHAR et al., 2014.

O processo de síntese desse estudo gerou moléculas que mantiveram o anel 7-cloro-4-aminoquinolínico. A cadeia lateral foi mantida e a adição de grupos volumosos foi interessante. É possível verificar pelos valores de IS que o substituinte imina, da cadeia lateral trouxe uma atividade melhor para as moléculas do que as hidrazonas, sugerindo que esse substituinte pode potencializar a atividade. Em linhas gerais, os derivados testados estavam de acordo com alguns aspectos abordados na revisão de Manohar et al. (2014) e apresentaram bons resultados nos ensaios *in vitro*, com destaque especial, as moléculas hibridizadas com o grupamento imina. É importante observar os resultados obtidos para I2, que se apresentou menor citotoxicidade e maior potência antiplasmodial entre os demais, alcançando valor de CI_{50} em escala nanomolar ($CI_{50} < 92$ nM).

De acordo com a literatura, compostos considerados como muito promissores são denominados de *leads*. Estes apresentam valores de CI_{50} inferior a 100 nM e índice de seletividade não inferiores a 100. Além desses, outros critérios de eficácia do composto em estudos *in vivo* devem ser considerados como a eliminação de pelo menos 90% dos parasitos com uma dose inferior a 50mg/kg (KATSUNO et al., 2015).

6.4 ANÁLISE DO PH DO VACÚOLO DIGESTIVO

Diante dos bons resultados do grupo das iminas em testes *in silico* e *in vitro*, alguns derivados foram escolhidos para a execução dos ensaios posteriores, avaliando o possível mecanismo de ação e a atividade antimalárica *in vivo*. Foram então selecionados I6 e I7 devido aos seus resultados nos testes anteriores e disponibilidade de massa para o teste *in vivo*.

Foi avaliada a influência desses derivados sobre o vacúolo digestivo do parasito, com a finalidade de elucidar um provável mecanismo de ação. Para o homeostase do parasito, o vacúolo digestivo precisa manter um padrão de pH ácido em torno de 5,0 para que ocorra a ação de enzimas, como cisteínas, metaloproteinases, com a finalidade de degradar hemoglobina em heme e permitir a formação da hemozoína. Essa é uma forma de o parasito detoxificar o heme e sobreviver dentro da hemácia (WUNDERLICH et al., 2012).

Pelo fato de I6 e I7 serem derivados de 4- aminoquinolinas, foi utilizada uma metodologia capaz de verificar a possível alteração no pH do vacúolo digestivo do parasito. As 4-aminoquinolinas de forma geral, promovem um aumento do pH do vacúolo, inibindo a formação do cristal de hemozoína, permitindo que o heme tóxico livre se acumule culminando com um dano oxidativo e a morte do parasito (JACKSON et al., 2004). A avaliação da variação de pH dentro do vacúolo é ainda um desafio e diversos autores vem estudando o assunto com o objetivo de entender como essa organela funciona e quais poderiam ser os alvos da terapia antimalárica e fenômenos de resistência (KLONIS et al. 2007; HAYWARD, SALIBA e KIRK, 2006).

Para estudar o comportamento do pH do vacúolo, foi utilizada uma sonda (Lysonsensor- Invitrogen) (KLONIS et al., 2007) que se acumula no vacúolo digestivo e emite fluorescência. À medida que ocorre redução da acidez, ocorre também a redução da fluorescência, indicando um possível local de ação do derivado. Este fenômeno pode ser visualizado através de microscopia confocal.

Os dados de intensidade de fluorescência mostraram que com a adição de I6 e I7 na cultura, na concentração correspondente ao CI_{50} (obtido no ensaio HRPII), foi visualizado uma redução do pH no interior da organela. Essa observação está de acordo com o mecanismo de ação sugerido para outros de derivados de 4-aminoquinolinas, como a cloroquina. Ressalta-se a importância destes testes terem sido realizados com o clone W2 de *P. falciparum*, o que traz expectativas de que estas moléculas poderiam ser usadas contra parasitos resistentes.

6.5 TESTE *IN VIVO*

Após ser avaliado o provável mecanismo de ação *in vitro* de I6 e I7, os mesmos foram estudados frente ao modelo murino da infecção, ou seja, o modelo *in vivo*. O modelo de malária experimental tem sido utilizado há muitos anos como forma de avaliar os resultados de testes de quimioterapia antimalárica. As espécies *P. berghei*, *P. chabaudi*, *P. vinckey* e *P. yoelli* foram extraídas de roedores africanos e adaptadas para a criação em animais de laboratório. Apesar da correlação entre a malária em animais não ser igual à doença humana causada por *P. falciparum*, a infecção de camundongos com espécies adaptadas à murinos consegue reproduzir de forma semelhante alguns aspectos da infecção no homem. Nestes casos, para realização dos testes de drogas são recomendadas as espécies *P. berghei* ou *P. chabaudi* (NOGUEIRA e ROSÁRIO, 2010).

O modelo usado nesse trabalho baseou-se na infecção de camundongos suíços infectados por *P. berghei* NK65, capaz de levar os animais ao quadro de malária grave e consequente morte. O tratamento baseou-se no modelo supressivo proposto por Peters (1965), amplamente utilizado em diversos estudos de avaliação de novos candidatos a fármacos antimaláricos. Os camundongos são infectados pela via intraperitoneal com uma solução de hemácias infectadas por *P.berghei*. Após 4 horas de infecção, é realizado o primeiro tratamento, que se repete por mais três dias.

Para avaliar a resposta dos animais ao tratamento, foram analisados os valores de parasitemia dos animais no 5º dia pós-infecção (d.p.i), conforme proposto por Peters, e no 9º d.p.i, através da contagem da parasitemia. Além desse parâmetro outros foram avaliados, como a sobrevivência, variação de peso e análise histopatológica de baço e fígado.

O derivado I6 foi testado na dose de 15mg/kg e foi observada uma importante inibição da multiplicação do parasito no 5º d.p.i e no 9º d.p.i. Essa redução do quinto para o nono dia era esperada visto que o tratamento foi realizado somente até o quarto dia, e provavelmente com o passar do tempo o composto já havia sido metabolizado. Portanto I6 apresentou, neste estudo, atividade antimalárica supressora, e que foi confirmado pela análise estatística, quando a média das parasitemias foi comparada com o grupo não tratado.

O derivado I7 foi testado em duas concentrações: 15 mg/kg e 25 mg/kg. Na menor concentração, o valor de inibição no 5º d.p.i foi semelhante ao de I6 e no 9º d.p.i. o derivado ainda possuía atividade de acordo com Carvalho e colaboradores (1991). Na dose de 25 mg/kg ocorreu um aumento importante da inibição no 5º d.p.i (93,7%) e no 9º d.p.i esse valor foi próximo ao da concentração de 15mg/kg no mesmo dia.

Na malária pode ser observada uma redução do peso corporal no animal infectado. Nesse sentido, foi realizada medida do peso dos camundongos durante o experimento. Foi verificado que ocorreu uma variação do peso dos animais nos primeiros dias de infecção, mas aqueles tratados com artesunato houve aumento progressivo de massa. Como o tratamento com os derivados foi realizado de forma supressiva e que também a cloroquina não foi administrada em dose curativa, é possível entender que estes grupos não foram capazes de eliminar a infecção, e, portanto passada a ação e metabolização destes compostos ocorreu a progressão da doença e foi possível verificar a redução de peso. Quando a sobrevivência foi avaliada, os animais tratados com I6 sobreviveram mais do que os do grupo controle negativo. Quando avaliado a influência de I7 não houve diferença estatística entre os diferentes grupos analisados.

Outros estudos utilizando o modelo murino também avaliaram o papel de 4-aminoquinolinas hibridizadas *in vivo*. Soares e colaboradores (2015) avaliaram

uma série de híbridos, formados por derivados 4-aminoquinolinearil e 4-quinolinilhidrazinas, verificando atividade *in vitro* e *in vivo*, em camundongos suíços infectados por *P. berghei* NK65.

Manohar et al. (2012) propuseram a síntese de vários híbridos de 4-aminoquinolinas com pirimidinas usando uma cadeia linear diaminoalquina como substituintes. No seu estudo, os compostos tiveram boa atividade *in vitro* contra cepas resistentes e sensíveis e dois deles apresentaram excelente percentual de inibição de multiplicação do parasito (97% e 73,9%) quando testados a 10mg/kg pelo teste supressivo com 3 dias de tratamento.

Como a infecção malárica afeta o organismo como um todo, outros parâmetros, como a avaliação histológica do baço e fígado, foram analisados de modo a corroborar os resultados obtidos pelos resultados de inibição da parasitemia.

Os camundongos possuem fígado estruturalmente semelhante ao dos humanos, tornando-se estes animais um bom modelo para avaliar a influência da infecção malárica sobre esse órgão vital. Neste contexto, a infecção por *P. berghei* é amplamente utilizada em modelos *in vivo*, e por sua capacidade de produzir a forma grave da doença (RHARDJO et al., 2013). Uma característica importante da malária é formação de áreas de congestão nos sinusóides e hipertrofia dos macrófagos hepáticos, que surgem à medida que aumenta a quantidade de hemácias, parasitadas ou não, restos de parasito e hemozoína (BAHETI et al., 2003; HELEGBE et al., 2011).

Durante a malária, em infecções por *P. falciparum*, o fígado pode apresentar uma pigmentação negra acastanhada, que corresponde à hemozoína gerada pelo metabolismo do parasito. Esta pode ser fagocitada por macrófagos resultando na pigmentação que ao microscópio ótico se mostra refrigente (BAHETI et al. 2003).

O fígado do animal tratado com água e DMSO apresentou um aumento de células do sistema imunológico, evidenciadas pela coloração arroxeadada, aumento dos sinusóides hepáticos e vacuolização das células hepáticas. Outra característica marcante foi uma maior densidade de grânulos acastanhados, que correspondem a grânulos de hemozoína, segundo SHITTU et al., (2011). Observações semelhantes

sobre o aspecto morfológico do fígado em modelo murino de infecção têm sido relatadas.

Scaccabarozzi e colaboradores (2018), avaliando a patologia no fígado de camundongos infectados com *P. berghei* NK65, verificaram que os mesmos apresentavam elevados níveis de AST/ALT, quando comparados aos camundongos infectados por *P. chabaudi* AS, e elevado conteúdo de hemozoína livre, além de elevada parasitemia que era responsável pelo estresse oxidativo no órgão, que provavelmente estava diretamente relacionada a injúria hepática. Outra avaliação foi a respeito do infiltrado inflamatório, que estava presente, porém em quantidade menor do que na infecção por *P. chabaudi* AS. No presente trabalho foi possível observar alterações no fígado do animal pertencente ao grupo não tratado semelhantes aos achados de Scaccabarozzi et al. (2018), como aumento da densidade de hemozoína livre e infiltrado inflamatório.

Em um trabalho com biópsias retiradas de humanos infectados com *P. falciparum*, Baheti et al. (2003) observaram também hiperplasticidade de células imunes, vacuolização de núcleo e citoplasma, aumento dos sinusóides hepáticos e hiperpigmentação malárica. Estas observações foram semelhantes estruturalmente com os achados do animal do grupo controle negativo neste estudo.

Após o tratamento com I6 e I7 foi possível verificar de modo qualitativo uma tendência à reorganização dos tecidos, redução do infiltrado inflamatório e menor acúmulo de pigmentos de hemozoína. O mesmo comportamento ocorreu com o tratamento com a combinação artesunato e mefloquina e com a cloroquina.

O baço é um importante órgão linfóide e pode apresentar alterações decorrentes da infecção malárica (DEL PORTILLO, 2009). Neste trabalho foram verificados aspectos qualitativos do órgão de um animal tratado pelos diferentes derivados.

No presente estudo foi observado que nos animais não tratados ocorria um aumento de polpa vermelha, e a região referente à polpa branca não estava distinta entre as demais regiões. Com a adição dos derivados, foi possível observar uma tendência à reorganização dos tecidos, assim como ocorreu com o tratamento com os fármacos padrão, como a cloroquina e artesunato e mefloquina.

Alguns autores mostram que durante a infecção malária ocorre um afinamento da cápsula de tecido conjuntivo que reveste o órgão, devido a esplenomegalia, e que após o tratamento, a mesma pode voltar ao tamanho normal (MUBARAKI et al. 2016) . Neste trabalho, apesar de não terem sido utilizadas medidas de espessura, as amostras representativas visualmente não obtiveram redução.

Achtman e colaboradores (2003) avaliando diversas questões morfológicas e funcionais do baço em camundongos C57BL/6 infectados por *P. chabaudi chabaudi*, também observaram a expansão da polpa vermelha. As zonas marginais, que ficam transitoriamente perdidas no período agudo da infecção, e as regiões de células T e B ficaram indistintas. Porém, com o passar da infecção ocorreu uma reorganização do tecido. Vale ressaltar a diferença do perfil imunológico dos animais tratados nos estudos citados com o modelo suíço, o que pode levar a diferenças importantes nos resultados observados.

Os resultados observados nos órgãos avaliados podem ilustrar de outra forma, diferente da contagem da parasitemia, os aspectos positivos da administração de I6 e I7. Foi possível observar que ambos obtiveram bons valores de atividade antimalárica. De forma geral, os processos de síntese de novos derivados usando substituintes com potencial atividade biológica, como as hidrazonas e principalmente as iminas, foi promissor e pode contribuir para síntese e avaliação de novos compostos antimaláricos.

7 CONCLUSÃO

As moléculas apresentadas de forma geral foram promissoras na avaliação *in silico* da regra de Lipinski, apresentando boa predição para serem absorvidas e terem boa disponibilidade quando administradas pela via oral. As propriedades ADMET foram satisfatórias em relação aos processos de absorção e toxicidade. O metabolismo desses fármacos precisa ser avaliado em relação à interação com outras substâncias. Os ensaios de citotoxicidade *in vitro* mostraram que os derivados não são tóxicos para hemácias humanas, células Vero e WI26VA4, nas concentrações testadas. Foram ativos contra *P. falciparum* clone W2, apresentando índices de seletividade satisfatórios, principalmente no grupo I.

Os estudos de *docking* molecular mostram que os compostos, exceto H3, são capazes de interagir com o sítio ativo da enzima PfLDH, sendo um possível alvo de ação.

Os derivados I6 e I7 foram avaliados *in vitro* quanto a sua ação sobre o vacúolo digestivo do parasito e foi verificado que estão relacionados à redução do pH da organela. No ensaio supressivo *in vivo*, foi observado que os ambos derivados apresentaram importantes valores de inibição de multiplicação do parasito e quando a média das parasitemias foi avaliada, o composto I6 foi ativo, quando se comparou com a resposta obtida por animais tratados com água e DMSO.

Foi possível observar que os derivados das diferentes rotas sintéticas mostraram-se promissores gerando moléculas ativas contra os plasmódios. O grupo com substituinte imina se destacou por apresentar níveis elevados de IS, e as moléculas I6 e I7 apresentaram potencial atividade antimalárica.

8 REFERÊNCIAS

ACHAN, J.; TALISUNA, A. O.; ERHART, A.; YEKA, A.; TIBENDERANA, J. K.; BALIRAINÉ, F. N.; ROSENTHAL, P.J. ; D'ALESSANDRO, U. Quinine, an old anti-malarial drug in a modern world: role in the treatment of malaria. *Malaria journal*, v.10, n.1, p.144, 2011.

ACHTMAN, A. H., KHAN, M.; MACLENNAN, I. C.; LANGHORNE, J. *Plasmodium chabaudi chabaudi* infection in mice induces strong B cell responses and striking but temporary changes in splenic cell distribution. *The Journal of Immunology*, v.171, n.1, p.317-324, 2003.

AGUIAR, A. C.; CUNHA, A. C.; CERAVOLO, I. P.; GONÇALVES, R. A. C.; OLIVEIRA, A. J.; KRETTLI, A. U. *Aspidosperma* (Apocynaceae) plant cytotoxicity and activity towards malaria parasites. Part II: experimental studies with *Aspidosperma ramiflorum* *in vivo* and *in vitro*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.110, n.7, p.906-913, 2015.

ALECRIM, M. D. G. C.; ALECRIM, W.; MACÊDO, V. *Plasmodium vivax* resistance to chloroquine (R2) and mefloquine (R3) in Brazilian Amazon region. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.32, n.1, p.67-68, 1999.

ALQAHTANI, S. *In silico* ADME-Tox modeling: progress and prospects. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, v. 13, n. 11, p. 1147-1158, 2017.

AMARATUNGA, C.; LIM, P., SUON, S.; SRENG, S., MAO, S.; SOPHA, C.; SAM, B.; DEK, D.; TRY, V.; AMATO, R.; BLESSBORN, D.; SONG, L.; TULLO, G.S.; FAY, M.P.; ANDERSON, J.M. TARNING, J. ; FAIRHUST, R.M. Dihydroartemisinin–piperazine resistance in *Plasmodium falciparum* malaria in Cambodia: a multisite prospective cohort study. *The Lancet infectious diseases*, v.16, .3,p. 357-365, 2016.

AMINO, R.; THIBERGE, S.; SHORTE, S.; FRISCHKNECHT, F.; MÉNARD, R. Quantitative imaging of *Plasmodium* sporozoites in the mammalian host. *Comptes rendus biologiques*, v.329, n.11, p.858-862, 2006.

ANAND, A. C.; PURI, P. Jaundice in malaria. *Journal of gastroenterology and hepatology*, v. 20, n.9, 1322-1332, 2005.

ANDRADE-NETO, V.F.; BRANDÃO, M.G.L.; STEHMANN, J.R; OLIVEIRA, L.A., KRETTLI, A.U. Antimalarial activity of Cinchona-like plants used to treat fever and malaria in Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, v.87, p: 253-256, 2003.

ANTINARELLI, L. M.; SOUZA, I. O.; GLANZMANN, N.; CHAGAS, A. A.; PORCINO, G. N.; VASCONCELOS, E. G.; DA SILVA, A. D.; COIMBRA, E. S. Aminoquinoline compounds: Effect of 7-chloro-4-quinolinyldrazone derivatives against *Leishmania amazonenses*. *Experimental Parasitology*, v.171, p. 10-16, 2016.

ANTINORI, S.; GALIMBERTI, L.; MILAZZO, L.; CORBELLINO, M. Biology of human malaria plasmodia including *Plasmodium knowlesi*. *Mediterranean journal of hematology and infectious diseases*, v.4, n.1, 2012.

ASHLEY, E. A.; PYAE PHYO, A.; WOODROW, C. J. Malaria. *The Lancet*, v.391, n.10130, p.1608–1621, 2018.

BABIKER, H. A.; PRINGLE, S. J.; ABDEL-MUHSIN, A.; MACKINNON, M.; HUNT, P.; WALLIKER, D. High-level chloroquine resistance in Sudanese isolates of *Plasmodium falciparum* is associated with mutations in the chloroquine resistance transporter gene *pfcr1* and the multidrug resistance gene *pfmdr1*. *The Journal of infectious diseases*, v.183, n;10, p.1535-1538, 2001.

BAHETI, R.; LADDHA, P.; GEHLOT, R. S. Liver involvement in falciparum malaria—A Histo-pathological analysis. *Journal, Indian Academy of Clinical Medicine*, v.4, n.1, p.34-8, 2003.

BAIRD, J. K. Evidence and implications of mortality associated with acute *Plasmodium vivax* malaria. *Clinical microbiology reviews*, v.26, n.1, p.36-57, 2013.

BANCONE, G., MENARD, D., KHIM, N., KIM, S., CANIER, L., NGUONG, C., PHOMMASONE, K.; MAYXAY, M.; DITTRICH, S.; VONGSOUVATH, M.; FIEVET, N. ; LE HESRAN, J.Y.; BRIAND, V.; KEOMANY S.; NEWTON, P.N.; GORSAWUN, G.; TARDY, K.; CHU, C.S.; RATTANAPALROJ, O.; DONG, L.T.; QUANG, H.H.; TAM-UYEN, N.; THUY-NHIEN, N.; HIEN, T.T.; KALNOKY, M. NOSTEN, F. Molecular characterization and mapping of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) mutations in the Greater Mekong Subregion. *Malaria Journal*, v. 18, n.1, p.20, 2019.

BANERJEE, R.; LIU, J.; BEATTY, W.; PELOSOF, L.; KLEMBA, M.; GOLDBERG, D. E. 2002. Four plasmepsins are active in the *Plasmodium falciparum* food vacuole, including a protease with an active-site histidine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.99, n.2, p.990-995, 2002.

BARBOSA, C. D. S.; GUIMAR ES, D. S. M.; GON ALVES, A. M. M. N.; BARBOSA, M. C. D. S.; ALVES E COSTA, M. L.; NASCIMENTO JUNIOR, C. S.; GUIMARÃES, L.; RIBEIRO-VIANA, R.M.; DOS SANTOS, F.V.; BRITO, C.F.A.;VAROTTI, F.P.; VIANA, G.H.R.. Target-guided synthesis and antiplasmodial evaluation of a new fluorinated 3-alkylpyridine marine alkaloid analog. *ACS Omega*, v.2, n.11, p.8264-8272, 2017.

BARENDT, M.; JAIDEE, A.; KHAOHIRUN, N.; SINGHASIVANON, P.; NOSTEN, F. In vitro activity of ferroquine (SSR 97193) against *Plasmodium falciparum* isolates from the Thai-Burmese border. *Malaria journal*, v.6, n.1, p. 81, 2007.

BENIGNI, R.; BOSSA, C. Mechanisms of chemical carcinogenicity and mutagenicity: a review with implications for predictive toxicology. *Chemical reviews*, v.111, n.4, p. 2507-2536, 2011.

BERMAN, J.D. Approval of Tafenoquine for Malaria Chemoprophylaxis. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 18. doi: 10.4269/ajtmh.19-0001, 2019.

BIBI, Z. Role of cytochrome P450 in drug interactions. *Nutrition & metabolism*, v.5, n.1, p. 27,2008.

BRIDGFORD, J. L.; XIE, S. C.; COBBOLD, S. A.; PASAJE, C. F. A.; HERRMANN, S.; YANG, T.; GILLETT, D.VL.; DICK, L.R.; RALPH, S.A.; DOGOVSKI, C.; SPILLMAN, N. J. Artemisinin kills malaria parasites by damaging proteins and inhibiting the proteasome. *Nature communications*, v.9, n.1, p. 3801, 2018.

BUFFET, P. A.; SAFEUKUI, I.; MILON, G.; MERCEREAU-PUIJALON, O.; DAVID, P. H. Retention of erythrocytes in the spleen: a double-edged process in human malaria. *Current opinion in hematology*, v.16, n.3, p.157-164, 2009.

BURGESS, S. J.; KELLY, J. X.; SHOMLOO, S.; WITTLIN, S.; BRUN, R.; LIEBMANN, K.; PEYTON, D. H. Synthesis, structure- activity relationship, and mode-of-action studies of antimalarial reversed chloroquine compounds. *Journal of medicinal chemistry*, v.53, n.17, p. 6477-6489, 2010.

CAMARGO, E.P. Malaria, maleita, paludismo. *Ciência e Cultura*, v. 55, p.26-32. 2003.

CARLTON, J. M.; FIDOCK, D. A.; DJIMDÉ, A.; PLOWE, C. V.; WELLEMS, T. E. Conservation of a novel vacuolar transporter in *Plasmodium* species and its central role in chloroquine resistance of *P. falciparum*. *Current opinion in microbiology*, v.4, n.4, p. 415-420, 2001.

CARVALHO, B. O. Análise das capacidades citoadesivas de *Plasmodium vivax* de pacientes da Amazônia Brasileira. 2010.158 f. Tese (Instituto de Biologia) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

CARVALHO, L. H.; BRANDÃO, M. G. L.; SANTOS-FILHO, D.; LOPES, J. L. C.; KRETLI, 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. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, v.24, n.11, p.1113-1123, 1991.

CDC, 2019. Disponível em: <https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/mosquitoes/>. Acesso: janeiro de 2019

CERUSO, M.; CARTA, F.; OSMAN, S. M.; ALOTHMAN, Z.; MONTI, S. M.; SUPURAN, C. T. Inhibition studies of bacterial, fungal and protozoan β -class carbonic anhydrases with Schiff bases incorporating sulfonamide moieties. Bioorganic & medicinal chemistry, v.23, n.15, p. 4181-4187, 2015.

CHAVES, L. F.; TALEO, G.; KALKOA, M.; KANEKO, A. Spleen rates in children: an old and new surveillance tool for malaria elimination initiatives in island settings. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, v.105, n.4, p.226-231, 2011.

CHENG, F.; LI, W.; ZHOU, Y.; SHEN, J.; WU, Z.; LIU, G.; LEE, P.W.; TANG, Y. AdmetSAR: A comprehensive source and free tool for assessment of chemical ADMET properties. Journal of Chemical Information and Modeling v. 52, n. 11, p.3099–3105, 2012.

CHENG, Q.; CUNNINGHAM, J.; GATTON, M.L. Systematic Review of Sub-microscopic *P. vivax* Infections: Prevalence and Determining Factors. PLoS Neglected Tropical Diseases v. 9, n. 1, 2015.

CLARK, I. A.; SCHOFIELD, L. Pathogenesis of malaria. Parasitology Today, v. 16, n. 10, p. 451-454, 2000.

COMBRINCK, J. M.; MABOTHA, T. E.; NCOKAZI, K. K.; AMBELE, M. A.; TAYLOR, D.; SMITH, P. J.; HOPPE, H.C; EGAN, T. J. Insights into the role of heme in the mechanism of action of antimalarials. ACS chemical biology, v.8, n.1, p.133-137, 2013.

CORTOPASSI, W. A.; OLIVEIRA, A. A.; GUIMARÃES, A. P.; RENNÓ, M. N.; KRETTLI, A. U.; FRANÇA, T. C. Docking studies on the binding of quinoline derivatives and hemoitin to *Plasmodium falciparum* lactate dehydrogenase. Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, v.29, n.1, p. 207-218, 2011.

COWMAN, A. F.; BERRY, D.; BAUM, J. The cellular and molecular basis for malaria parasite invasion of the human red blood cell. Journal of Cell Biology v. 198, n. 6, p. 961–971, 2012.

COWMAN, A.F. The P-glycoprotein homologues of *Plasmodium falciparum*: Are they involved in chloroquine resistance? Parasitology Today v. 7, n. 4, p. 70–76, 1991.

COX-SINGH, J.; DAVIS, T. M.; LEE, K. S.; SHAMSUL, S. S.; MATUSOP, A.; RATNAM, S.; RAHMAN, H.A.; CONWAY, D.J; SINGH, B. *Plasmodium knowlesi* malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening. *Clinical infectious diseases*, v.46, n.2, 165-171, 2008.

CROCI, L.; COZZI, L.; STACCHINI, A.; DE MEDICI, D.; TOTI, L. A rapid tissue culture assay for the detection of okadaic acid and related compounds in mussels. *Toxicon*, v.35, n.2, p.223–230, 1997.

CUNICO, W. ; CARVALHO, S.A.; GOMES, C.R.B.; MARQUES, G.H. Fármacos antimalariais-história e perspectivas. *Revista Brasileira de Farmácia*, v.89, n. 1, p. 49-55, 2008.

DANEMAN, R.; PRAT, A. The blood–brain barrier. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, v.7, n.1, a020412, 2015.

DAYANANDA, K. K.; ACHUR, R. N.; GOWDA, D. C. Epidemiology, drug resistance, and pathophysiology of *Plasmodium vivax* malaria. *Journal of vector borne diseases*, v.55, n.1, p.1, 2018.

DE SOUSA, I. P.; BERNKOP-SCHNÜRCH, A. Pre-systemic metabolism of orally administered drugs and strategies to overcome it. *Journal of Controlled Release*, v. 192, p. 301-309, 2014.

DE SOUZA, N. B.; CARMO, A. M.; DA SILVA, A. D.; FRANÇA, T. C.; KRETTLI, A. U. Antiplasmodial activity of chloroquine analogs against chloroquine-resistant parasites, docking studies and mechanisms of drug action. *Malaria journal*, v.13, n.1, p. 469, 2014.

DEANE, L. Os grandes marcos na história do controle da malária. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 25, n. Suppl II, p. 12-22, 1992.

DEL PORTILLO, H. A.; FERRER, M.; BRUGAT, T.; MARTIN-JAULAR, L.; LANGHORNE, J.; LACERDA, M. V. The role of the spleen in malaria. *Cellular microbiology*, v.14, n.3, p. 343-355, 2012.

DONDORP, A. M.; INCE, C.; CHARUNWATTHANA, P.; HANSON, J.; KUIJEN, A. V., FAIZ, RAHMAN, M.R.; HASAN, M.; YUNUS, E.B.; GHOSE, A.; RUANGVEERAYUT, R.; LIMMATHUROTSAKUL, D.; MATHURA, K.; WHITE, N.N.; DAY, N.P.J. Direct in vivo assessment of microcirculatory dysfunction in severe falciparum malaria. *The Journal of infectious diseases*, v.197, n.1, p. 79-84, 2008.

DOS SANTOS FILHO, J. M.; MACEDO, T. S.; TEIXEIRA, H. M. P.; MOREIRA, D. R. M.; CHALLAL, S.; WOLFENDER, J. L.; QUEIROZ, E.F.; SOARES, M. B. P.

Conjugation of N-acylhydrazone and 1, 2, 4-oxadiazole leads to the identification of active antimalarial agents. *Bioorganic & medicinal chemistry*, v.24, n.22, p. 5693-5701, 2016.

DUNST, J.; KAMENA, F.; MATUSCHEWSKI, K. Cytokines and chemokines in cerebral malaria pathogenesis. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, v.7, p.324, 2017.

DYER, M; DAY, K P. Commitment to Gametocytogenesis in *Plasmodium falciparum*. *Parasitology today*, v. 16, n. 3, p.102-107, 2000.

EGAN, T. J. Recent advances in understanding the mechanism of hemozoin (malaria pigment) formation. *Journal of inorganic biochemistry* v. 102, n. 5–6, p. 1288 -1299, 2008.

EGAN, T. J.; CHEN, J. Y.; DE VILLIERS, K. A.; MABOTHA, T. E.; NAIDOO, K. J.; NCOKAZI, K. K.; LANGFORD, S.T.; MCNAUGHTON, D.; PANDIANCHERRI, S.; WOOD, B. R. Haemozoin (β -haematin) biomineralization occurs by self-assembly near the lipid/water interface. *FEBS letters*, v.580, n.21, p-5105-5110, 2006.

EGAN, T. J.; MARQUES, H. M. The role of haem in the activity of chloroquine and related antimalarial drugs. *Coordination Chemistry Reviews* v. 190–192, p. 493–51, 1999.

EGAN, T; COMBRINCK, J. M., EGAN, J.; HEARNE, G. R.; MARQUES, H. M., NIENTENI, S.; SEWELL, B. T.; SMITH, P.J.; TAYLOR, D.; SCHALKWYK, D.A.V.; WALDEN, J. C. Fate of haem iron in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Biochemical journal*, v.365, n.2, p. 343-347, 2002.

EL-SHERBENI, A. A.; EL-KADI, A. O. S. Microsomal cytochrome P450 as a target for drug discovery and repurposing. *Drug metabolism reviews*, 49(1), 1–17, 2016.

FAN, J.; DE LANNOY, I. A. Pharmacokinetics. *Biochemical Pharmacology*, v.87, n.1, p. 93–120, 2014.

FERNANDO, D.; RODRIGO, C.; RAJAPAKSE, S. Primaquine in vivax malaria: an update and review on management issues. *Malaria journal*, v.10, n.1, 351, 2011.

FERREIRA, M. U.; CASTRO, M.C. Challenges for malaria elimination in Brazil. *Malaria Journal* v. 15, n. 1, p. 284, 2016.

FERRER, M.; MARTIN-JAULAR, L.; DE NIZ, M.; KHAN, S. M. ; JANSE, C. J.; CALVO, M.; HEUSSLER, V.; DEL PORTILLO, H. A. Imaging of the spleen in malaria. *Parasitology international*, v.63, n.1, 195-205, 2024.

FIDOCK, D. A.; NOMURA, T.; TALLEY, A. K.; COOPER, R. A.; DZEKUNOV, S. M.; FERDIG, M. T.; URSOS, L.M.B.; SIDHU, A.S.; NAUDE, B.; DEITSCH, K.W.; SU, X-Z.; WOOTTON, J. C. ; ROEPE, P.D.; WELLEMS, T.E. Mutations in the *P. falciparum* digestive vacuole transmembrane protein PfCRT and evidence for their role in chloroquine resistance. *Molecular cell*, v.6, n.4, p- 861-871, 2000

FITCH, C. D.; KANJANANGGULPAN, P. The state of ferriprotoporphyrin IX in malaria pigment. *Journal of biological chemistry* v. 262, n. 32, p. 15552–15555, 1987.

FOLEY, M.; TILLEY, L. 1997. Quinoline antimalarials: mechanisms of action and resistance. *International journal for parasitology*, v. 27, n.2, p. 231-240, 1997.

FONG, K. Y; WRIGHT, D. W. Hemozoin and antimalarial drug discovery. *Future medicinal chemistry* v. 5, n. March, p. 1437–50, 2013.

FORTIN, S.; BÉRUBÉ, G. Advances in the development of hybrid anticancer drugs. *Expert opinion on drug discovery* v. 8, n. 8, p. 1029–1047, 2013.

FRANÇA, T. C.; SANTOS, M. G. D.; FIGUEROA-VILLAR, J. D. Malária: aspectos históricos e quimioterapia. *Quimica nova*, v.31, n.5, 1271-1278, 2008.

FREDLUND, L.; WINIWARTER, S.; HILGENDORF, C. In vitro intrinsic permeability: a transporter-independent measure of Caco-2 cell permeability in drug design and development. *Molecular pharmaceutics*, v. 14, n. 5, p. 1601-1609, 2017.

FREVERT, U.; SINNIS, P.; CERAMI, C.; SHREFFLER, W.; TAKACS, B.; NUSSENZWIEG, V. Malaria circumsporozoite protein binds to heparan sulfate proteoglycans associated with the surface membrane of hepatocytes. *Journal of experimental medicine*, v.177, n.5, p-1287-1298, 1993.

FRIED, M.; DUFFY, P. E. Malaria during Pregnancy. *Cold Spring Harbor Perspectives in medicine*, v.7, n.6, 2017.

FUNASA 2001. Manual de Terapêutica da Malária. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/funasa/manu_terapeutica_malaria.pdf
Acesso em: 13 de janeiro de 2019.

GASCO, A.; BOSCHI, D.; CHEGAEV, K.; CENA, C.; DI STILO, A.; FRUTTERO, R.; LAZZARATO, L.; ROLANDO, B.; TOSCO, P. Multitarget drugs: Focus on the NO-donor hybrid drugs. *Pure and applied chemistry*, v.80, n.8, p.1693-1701, 2008.

GASPAR, E.; MOTA, D A. Anti-Hipertensivos Multi-Alvo . [S.l: s.n.] , 2015.

GELBAND, H.; PANOSIAN, C. B.; ARROW, K. J. (Eds.). Saving lives, buying time: economics of malaria drugs in an age of resistance. National Academies Press, 2004.

GEMMA, S.; KUKREJA, G.; FATTORUSSO, C.; PERSICO, M.; ROMANO, M. P., ALTARELLI, M., SAVINE, L.; CAMPIANI, G.; FATTORUSSO, E.; BASILICO, N.; TARAMELLI, D.; YARDLEY, V., BUTIBI, S. Synthesis of N1-arylidene-N2-quinoly- and N2-acrydinylhydrazones as potent antimalarial agents active against CQ-resistant *P. falciparum* strains. Bioorganic & medicinal chemistry letters, v.16, n. 20, p. 5384-5388, 2006.

GLEESON, P. M.; HERSEY, A.; HANNONGBUA, S. In-Silico ADME Models: A General Assessment of their Utility in Drug Discovery Applications. Current topics in medicinal chemistry, v.11, n.4, p. 358-382, 2011.

GOLDBERG, D. E.; SLATER, A. F.; CERAMI, A.; HENDERSON, G. B. Hemoglobin degradation in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*: an ordered process in a unique organelle. Proceedings of the national academy of sciences, v.87, n.8, p. 2931-2935, 1990.

GORKA, A. P.; DE DIOS, A.; ROEPE, P. D. Quinoline drug-heme interactions and implications for antimalarial cytostatic versus cytotoxic activities. Journal of medicinal chemistry, v. 56, n.13, p. 5231-5246, 2013.

GRANCHI, C.; BERTINI, S.; MACCHIA, M.; MINUTOLO, F. Inhibitors of Lactate Dehydrogenase isoforms and their therapeutic potentials. Current medicinal chemistry, v.17, n.7, p. 672-697, 2010.

GUEDES, F.L. Obtenção dos sistemas de dispersão sólida e complexos de inclusão para solubilização de Benzilideno-Imidazolidina-2,4-Diona e Benzilideno- Tiazolidina-2,4-Diona. 2008. 116 f. (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2008.

GUEIRARD, P.; TAVARES, J.; THIBERGE, S.; BERNEX, F.; ISHINO, T.; MILON, G.; FRANKE-FAYARD, B.; JANSE, C.J.; MÉNARD, R.; AMINO, A. Development of the malaria parasite in the skin of the mammalian host. Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America, v. 107, n.43, p.18640-18645, 2010.

GUENGERICH, F. P. Cytochrome p450 and chemical toxicology. Chemical research in toxicology, v.21, n.1, p. 70-83, 2007.

HAN, X. M.; OUYANG, D. S.; CHEN, X. P.; SHU, Y.; JIANG, C. H.; TAN, Z. R.; ZHOU, H. H. Inducibility of CYP1A2 by omeprazole in vivo related to the genetic polymorphism of CYP1A2. British journal of clinical pharmacology, v.54, n.5, p. 540-543, 2002.

HAYWARD, R.; SALIBA, K. J.; KIRK, K. The pH of the digestive vacuole of *Plasmodium falciparum* is not associated with chloroquine resistance. *Journal of cell science*, v.119, n.6, p.1016-1025, 2006.

HELEGBE, G.K.; YANAGI, T.; SENBA, M.; HUY, N.T.; SHUAIBU, M.N.; YAMAZAKI, A.; KIKUCHI, M.; YASUNAMI, M.; HIRAYAMA, K. Histopathological studies in two strains of semi-immune mice infected with *Plasmodium berghei* ANKA after chronic exposure. *Parasitology research*, v. 108, p. 807-814, 2011.

HILL, D. R.; BAIRD, J. K.; PARISE, M. E.; LEWIS, L. S.; RYAN, E. T.; MAGILL, A. J. Primaquine: report from CDC expert meeting on malaria chemoprophylaxis I. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v.75, n.3, p. 402-415, 2006.

HOFFMAN, S. L.; VEKEMANS, J.; RICHIE, T. L.; DUFFY, P. E. The march toward malaria vaccines. *Vaccine*, 33, p. D13-D23, 2015.

HONG, Y. L.; YANG, Y. Z.; MESHNICK, S.R. The interaction of artemisinin with malarial hemozoin. *Molecular and biochemical parasitology* v. 63, n. 1, p. 121–128 , 1994.

HOWES, R. E.; BATTLE, K. E.; MENDIS, K. N.; SMITH, D. L.; CIBULSKIS, R. E.; BAIRD, J. K.; HAY, S. I. Global epidemiology of *Plasmodium vivax*. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 95, (6_Suppl), p. 15-34, 2016.

HOWES, R. E.; PIEL, F. B.; PATIL, A. P.; NYANGIRI, O. A.; GETHING, P. W.; DEWI, M.; HOGG, M.M.; BATTLE, K.E.; PADILLA, C.D.; BAIRD, J.K.; HAY, S. I. G6PD deficiency prevalence and estimates of affected populations in malaria endemic countries: a geostatistical model-based map. *PLoS medicine*, v.9, n.11, e1001339, 2012.

HOWES, R. E.; REINER JR R. C.; BATTLE, K. E.; LONGBOTTOM, J.; MAPPIN, B.; ORDANOVICH, D.; TATEM, A.J.; DRAKELEY, C.; GETHING, P.W.; ZIMMERMAM, P.A.; SMITH, D. L.; HAY, S.I. *Plasmodium vivax* transmission in Africa. *PLoS neglected tropical diseases*, v.9, n.11, 2015.

HU, Y.-Q.; GAO, C.; ZHANG, S.; XU, L.; XU, Z.; FENG, L.-S.; WU, X.; ZHAO, F. Quinoline hybrids and their antiplasmodial and antimalarial activities. *European Journal of medicinal chemistry*, v.139,p. 22 - 47, 2017.

IRIEMENAM, N. C.; OKAFOR, C. M.; BALOGUN, H. A.; AYEDE, I.; OMOSUN, Y.; PERSSON, J. O.; HAGSTEDT, M.; ANUMUDU, C.I.; NWUBA, N.I.; TROYE-BLOMBERG, M.; BERZINS, K. Cytokine profiles and antibody responses to *Plasmodium falciparum* malaria infection in individuals living in Ibadan, southwest Nigeria. *African health sciences*, v.9, n.2, 2009.

JACKSON, K. E., KLONIS, N., FERGUSON, D. J., ADISA, A., DOGOVSKI, C., & TILLEY, L. (2004). Food vacuole-associated lipid bodies and heterogeneous lipid environments in the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *Molecular microbiology*, v.54, n.1, p.109-122, 2004.

JAYABALASINGHAM, B.; BANO, N.; COPPENS, I. Metamorphosis of the malaria parasite in the liver is associated with organelle clearance. *Cell research*, v. 20, n.9, 1043, 2010.

JUNIOR, S.G. B. D.; PINTO, J. R.; BARROS, E. J. G.; FARIAS, G. M. N.; DAHER, E. D. F. Kidney involvement in malaria: an update. *Revista do instituto de medicina tropical de São Paulo*, v. 59, 2017.

KAFSACK, B.F.; ROVIRA-GRAELLS, N.; CLARK, T.G.; BANCELLS, C.; CROWLEY, V.M.; CAMPINO, S.G.; WILLIAMS, E.A.; DROUGHT, L.G.; KWIATKOWSKI, P. D., BAKER, D. A.; CORTÉS, A.; CORTÉS, A.; LLINÁS, M. A transcriptional switch underlies commitment to sexual development in malaria parasites. *Nature*, v.507, n.7491, p. 248, 2014.

KAKANI, P.; SUMAN, S.; GUPTA, L.; KUMAR, S. Ambivalent outcomes of cell apoptosis: a barrier or blessing in malaria progression. *Frontiers in microbiology*, v. 7, p. 302, 2016.

KALANTARI, P. The emerging role of pattern recognition receptors in the pathogenesis of malaria. *Vaccines*, v. 6, n. 1, p. 13, 2018.

KASHYAP, A.; CHETIA, D.; RUDRAPAL, M. Synthesis, Antimalarial Activity Evaluation and Drug likeness Study of Some New Quinoline-Lawsone Hybrids. *Indian journal of pharmaceutical sciences*, v. 78, n. 6, p. 801-809, 2017.

KATSUNO, K.; BURROWS, J.N.; DUNCAN, K.; HUIJSDUIJNEN, R.H.V.; KANEKO, T.; KITA, K.; MOWBRAY, C.E.; SCHMATZ, D.; WARNER; SLINGSBY, B.T. Hit and lead criteria in drug discovery for infectious diseases of the developing world. *Nature publishing group* n. October, p. 1–8, 2015.

KERRU, N.; SINGH, P.; KOORBANALLY, N.; RAJ, R.; KUMAR, V. Recent advances (2015–2016) in anticancer hybrids. *European journal of medicinal chemistry*, v.142, p.179-212, 2017.

KLAYMAN, D. L. Qinghaosu (Artemisinin): An Antimalarial Drug from China CH30F0. n. 16, 1983.

KLONIS, N.; TAN, O.; JACKSON, K.; GOLDBERG, D.; KLEMPA, M.; TILLEY, L. Evaluation of pH during cytosomal endocytosis and vacuolar catabolism of

haemoglobin in *Plasmodium falciparum*. *Biochemical journal*, v.407, n.3, p. 343-354, 2007.

KOCH, M.; WRIGHT, K. E.; OTTO, O.; HERBIG, M.; SALINAS, N. D.; TOLIA, N. H.; SATCHWELL, T., J.; GUCK, J.; BROOKS, N.J.; JAKE BAUM, J. *Plasmodium falciparum* erythrocyte-binding antigen 175 triggers a biophysical change in the red blood cell that facilitates invasion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.114, n.16, p. 4225-4230, 2017.

KOCHAR D.K.; DAS, A.; KOCHAR, S.K.; SAXENA, V.; SIROHI, P.; GARG, S.; KOCHAR, A.; KHATRI, M.P.; GUPTA, V. Severe *Plasmodium vivax* malaria: A report on serial cases from Bikaner in northwestern India. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.80, n.2, p. 94-8, 2009.

KRISHNA, S.; PULCINI, S.; MOORE, C. M.; TEO, B. H. Y.; STAINES, H. M. Pumped up: reflections on PfATP6 as the target for artemisinins. *Trends in pharmacological sciences*, v.35, n.1, p. 4-11, 2014.

KROTOSKI, W. A. Discovery of the hypnozoite and a new theory of malarial relapse. *Transactions of the Royal Society of tropical Medicine and Hygiene*, v.79,

LABEL REVIEW MANUAL, EPA: Chapter 7: "precautionary statements" Washington, D.C 2012.

LAMBROS, C.; VANDERBERG, J. P. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *The Journal of parasitology*, v 65, n. 3, p. 418-420, 1979.

LARREGIEU, C. A.; BENET, L. Z. Drug discovery and regulatory considerations for improving in silico and in vitro predictions that use Caco-2 as a surrogate for human intestinal permeability measurements. *The AAPS journal*, v.15, n.2. p.483-497, 2013.

LAVANDEIRA, F.M.F. Ensaio toxicológicos pré-clínicos na avaliação da segurança de novos fármacos. 70f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Fernando Pessoa. Porto, Portugal, 2014

LEARY, J. J.; WITTRICK, R.; SARISKY, R.T, WEINBERG, A., LEVIN, M.J. Susceptibilities of herpes simplex viruses to Penciclovir and Acyclovir in eight cell lines. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v.46, n.3, p.762-768, 2002.

LEESON, P. D.; SPRINGTHORPE, B. The influence of drug-like concepts on decision-making in medicinal chemistry. *Nature reviews drug discovery*, v.6, n.11, 2007.

LEITE, F. H. A.; FONSECA, A.; NUNES, R. R.; JÚNIOR, M.; VAROTTI, F.; TARANTO, A. G. Malaria: from old drugs to new molecular targets. *Biochemistry and biotechnology reports*, v.2, p. 59-76, 2013.

LI, X.; CHEN, L.; CHENG, F.; WU, Z.; BIAN, H.; XU, C.; LI, W.; LIU, G., TANG, Y. (2014). In silico prediction of chemical acute oral toxicity using multi-classification methods. *Journal of chemical information and modeling*, v.54, n.4, p.1061-1069.

LIN, J. H. Applications and limitations of interspecies scaling and in vitro extrapolation in pharmacokinetics. *Drug metabolism and disposition*, v.26, n.12, p.1202-1212, 1998.

LIN, J.; SAHAKIAN, D. C.; DE MORAIS, S. M.; XU, J. J.; POLZER, R. J.; WINTER, S. M. The role of absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity in drug discovery. *Current topics in medicinal chemistry*, v.3, n.10, p.1125-1154, 2003.

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.

LÖDIGE, M.; HIRSCH, L. Design and synthesis of novel hybrid molecules against malaria. *International journal of medicinal chemistry*, 2015.

LOIOLA, C. C. P.; SILVA, C. J.; TAUIL, P. L. Controle da malária no Brasil: 1965 a 2001. *Revista panamericana de salud pública*, v. 11, p. 235-244, 2002.

LOUP, C.; LELIÈVRE, J.; BENOIT-VICAL, F.; MEUNIER, B. Trioxaquinones and heme-artemisinin adducts inhibit the in vitro formation of hemozoin better than chloroquine. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v.51, p.10, p. 3768-3770, 2007.

LU, A. Y. Drug-metabolism research challenges in the new millennium: individual variability in drug therapy and drug safety. *Drug metabolism and disposition*, v.26, n.12, p.1217-1222, 1998.

MABKHOT, Y., ALATIBI, F., EL-SAYED, N., AL-SHOWIMAN, S., KHEDER, N., WADOOD, A.; RAUF, A.; BAWAZEER, S.; HADDA, T. B. Antimicrobial Activity of Some Novel Armed Thiophene Derivatives and Petra/Osiris/Molinspiration (POM) Analyses. *Molecules*, v.21, n.2, p.222, 2016.

MADRID, P. B.; SHERRILL, J.; LIOU, A. P.; WEISMAN, J. L.; DERISI, J. L.; GUY, R. K. Synthesis of ring-substituted 4-aminoquinolines and evaluation of their antimalarial activities. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, v.15, n.4, p.1015-1018, 2005.

MAHMOUDI, N.; DE JULIÁN-ORTIZ, J.-V.; CICERON, L.; GÁLVEZ, J.; MAZIER, D.; DANIS, M.; DEROUIN, D.; GARCÍA-DOMENECH, R. Identification of new antimalarial drugs by linear discriminant analysis and topological virtual screening. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, v.57, n.3, p. 489 - 497, 2006.

MANOHAR, S.; KHAN, S. I.; RAWAT, D.S. 4-aminoquinoline-triazine-based hybrids with improved in vitro antimalarial activity against cq-sensitive and cq-resistant strains of *Plasmodium falciparum*. *Chemical biology & drug design*, v. 81, n. 5, p. 625-630, 2013.

MANOHAR, S.; RAJESH, U. C.; KHAN, S. I.; TEKWANI, B. L.; RAWAT, D. S. Novel 4-aminoquinoline-pyrimidine based hybrids with improved *in vitro* and *in vivo* antimalarial activity. *ACS medicinal chemistry letters*, v.3.n.7, p. 555-559, 2012.

MANOHAR, S.; TRIPATHI, M.; RAWAT, S. D. 4-Aminoquinoline based molecular hybrids as antimalarials: an overview. *Current topics in medicinal chemistry*, v.14, n.14, p.1706-1733, 2014.

MATUSCHEWSKI, K.; NUNES, A. C.; NUSSENZWEIG, V.; MÉNARD, R. *Plasmodium* sporozoite invasion into insect and mammalian cells is directed by the same dual binding system. *The EMBO journal*, v.21, n.7, p. 1597-1606, 2002.

MAURYA S.S.; KHAN, S.I.; BAHUGUNA, A.; KUMAR, D.; RAWAT, D.S. Synthesis, antimalarial activity, heme binding and docking studies of N-substituted 4-aminoquinoline-pyrimidine molecular hybrids. *European journal of medicinal chemistry*, v.129, p.175-185, 2017.

MELNYK, P.; LEROUX, V.; GRELLIER, P. Design, synthesis and in vitro antimalarial activity of an acylhydrazone library. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, v. 16, n.1, p. 31–35, 2006.

MENG, X.-Y.; ZHANG, H.-X.; MEZEI, M.; CUI, M. Molecular Docking: A Powerful Approach for Structure-Based Drug Discovery. *Current computer aided-drug design*, v.7, n.2, 146–157, 2011.

MENTING, J. G.; TILLEY, L.; DEADY, L. W.; NG, K.; SIMPSON, R. J.; COWMAN, A. F.; FOLEY, M. The antimalarial drug, chloroquine, interacts with lactate dehydrogenase from *Plasmodium falciparum*. *Molecular and biochemical parasitology*, v.88, n.1-2, p. 215-224, 1997.

MESHNICK, S. R.; DOBSON, M. J. The history of antimalarial drugs. *Antimalarial chemotherapy*. Humana Press, p. 15-25, 2001.

MESHNICK, S. R.; JEFFORD, C. W.; POSNER, G. H.; AVERY, M. A.; PETERS, W.

Second-generation antimalarial endoperoxides. *Parasitology today*, v.12, n.2, p. 79-82, 1996.

MEUNIER, B. Hybrid Molecules with a Dual Mode of Action: Dream or Reality? *Accounts of chemical research*, v. 41, n.1, p. 69–77, 2008.

MILLER, L. H.; ACKERMAN, H. C.; SU, X. Z.; WELLEMS, T. E. Malaria biology and disease pathogenesis: insights for new treatments. *Nature medicine*, v.19, n.2, p. 156- 167, 2013.

MILLER, L. H.; BARUCH, D. I.; MARSH, K.; DOUMBO, O. K. The pathogenic basis of malaria. *Nature*, v.415, n.6872, p. 673-679, 2002.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Brasil. Disponível em: <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/malaria/medidas-de-prevencao-e-controle>. Acesso em: 07/01/19.

MINISTERIO DA SAUDE, PORTAL DA SAÚDE. 2017. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/662-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/malaria/11346-situacao-epidemiologica-dados>

MINISTERIO DA SAUDE. Guia de vigilância em saúde. 1º edição, Brasília, 775 f, 2016.

MINISTERIO DA SAUDE. Guia prático do tratamento da malária no Brasil, 2010. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_pratico_malaria.pdf. Acesso em: 11/01/19.

MINISTERIO DA SAUDE. MALÁRIA. Brasil. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/662-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/malaria/11343-informacoes-tecnicas>. Acesso em: 03 de maio de 2017.

MINISTERIO DA SAUDE. Manual de Diagnóstico Laboratorial da Malária. Série A. Normas e Manuais Técnicos. 2ª edição, Brasília, 116 f., 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de diagnóstico laboratorial da malária. Brasil, 2º edição. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_diagnostico_laboratorial_malaria_2ed.pdf, acesso: 07/01/19.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Mapa de risco da malária por município de infecção, Brasil, 2017. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/abril/16/Mapa-de-risco-mal-ria->

2017.pdf. Acesso em 04/01/2019.

MODA, T.L. Modelagem in silico de propriedades farmacocinéticas para a avaliação de candidatos a novos fármacos. 2011. 218f.(Doutorado em ciência) - Universidade de São Paulo, São Carlos.

MOHAN, A.; SHARMA, S. K.; BOLLINENI, S. Acute lung injury and acute respiratory distress syndrome in malaria. *Journal of vector borne diseases*, v. 45, n. 3, p.179-93, 2008.

MORADHASELI, S.; MIRAKABADI, A. Z.; SARZAEEM, A.; KAMALZADEH, M.; HOSSEINI, R. H. Cytotoxicity of ICD-85 NPs on human cervical carcinoma HeLa cells through caspase-8 mediated pathway. *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR*, v.12, n.1, p.155, 2013.

MORRISSETTE, N. S.; SIBLEY, L. D. Cytoskeleton of apicomplexan parasites. *Microbiology and molecular biology reviews*, v. 66, n. 1, p. 21-38, 2002.

MOTA, M. M.; PRADEL, G.; VANDERBERG, J. P.; HAFALLA, J. C.; FREVERT, U.; NUSSEN WEIG, R. S.; NUSSEN WEIG, V.; RODRIGUEZ, A. Migration of *Plasmodium* sporozoites through cells before infection. *Science*, v. 291, n. 5501, p.141-144, 2001.

MOTA, M. M.; RODRIGUEZ, A. New Pieces for the Malaria Liver Stage Puzzle: Where Will They Fit? *Cell host and microbe* v. 3, n. 2, p. 63–65, 2008.

MOTA, M. M; RODRIGUEZ, A. Invasion of mammalian host cells by *Plasmodium* sporozoites. *Bioessays*, p. 149–156 , 2002.

MUBARAKI, M. A.; HAFIZ, T. A.; DKHIL, M. A.; AL-QURAI SHY, S. Beneficial effect of *Punica granatum* peel extract on murine malaria-induced spleen injury. *BMC complementary and alternative medicine*, v.16, n.1, p. 221, 2016.

MUEGGE, I. Selection criteria for drug-like compounds. *Medicinal research reviews*, v.23, n.3, p. 302-321, 2003.

MURTAZA, G., ; MUNTAZ, A.; KHAN, F.A.; AHMAD, S.; AZHAR, S.; NAJAM-IL-HAQ, M.; ATIF, M.; KHAN, S.A.; MAALIK, A.; ALAM, F.; HUSSAIN, I. Recent pharmacological advancements in schiff bases: A review. *Acta poloniae pharmaceutica*, v.71, p. 531-535, 2014.

MUSHTAQUE, M.; SHAHJAHAN. Reemergence of Chloroquine (CQ) analogs as Multi-targeting antimalarial agents: A review. *European journal of medicinal chemistry* v. 27, n. 90, p. 280–295, 2015.

NOEDL, H., WONGSRICHANALAI, C., MILLER, R. S., MYINT, K. S. A., LOOAREESUWAN, S., SUKTHANA, Y., WONGCHOTIGUL, V.; KOLLARITSCH, H.; WIEDERMANN, G.; WERNSDORFER, W. H. *Plasmodium falciparum*: effect of anti-malarial drugs on the production and secretion characteristics of histidine-rich protein II. *Experimental parasitology*, v.102, n.3-4, p.157-163, 2002.

NOGUEIRA, F.; ROSÁRIO, V. E. D. Methods for assessment of antimalarial activity in the different phases of the *Plasmodium* life cycle. *Revista pan-amazônica de saúde*, v.1, n.3, p.109-124, 2010.

NQORO, X.; TOBEKA, N.; ADERIBIGBE, B. Quinoline-based hybrid compounds with antimalarial activity. *Molecules*, v. 22, n. 12, p. 2268, 2017.

NRCS, U.; KRAMER, J. Chapter 7: precautionary statements. in: NYLÉN, S., GAUTAM, S. Immunological perspectives of leishmaniasis. *Journal of global infectious diseases*. v. 2, n.2, p. 135. 2014.

NUNES, R. R.; COSTA, M. D. S.; SANTOS, B. D. R.; FONSECA, A. L. D.; FERREIRA, L. S., CHAGAS, R. C. R.; SILVA, A.M.; VAROTTI, F.P.; TARANTO, A. G. Successful application of virtual screening and molecular dynamics simulations against antimalarial molecular targets. *Memórias do instituto Oswaldo Cruz*, v.111, n.12, p. 721-730, 2016.

O'BRIEN, C.; HENRICH, P. P.; PASSI, N.; FIDOCK, D. A. Recent clinical and molecular insights into emerging artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum*. *Current opinion in infectious diseases*, v.24, n.6, p. 570, 2011.

O'NEILL, P. M.; BARTON, V. E.; WARD, S. A. The molecular mechanism of action of artemisinin-the debate continues. *Molecules*, v.15, n.3, p.1705-1721, 2010.

OLIVEIRA, A. A.; FRANÇA, T. C. C. Lactato desidrogenase como alvo molecular para quimioterapia antimalarial. *Revista militar de ciência e tecnologia*, n. 28, p. 24-39, 2011.

OLIVEIRA-FERREIRA, J.; LACERDA, M. V.; BRASIL, P.; LADISLAU, J. L.; TAUIL, P. L.; DANIEL-RIBEIRO, C. T. Malaria in Brazil: an overview. *Malaria journal*, v.9, n.1, 115, 2010.

O'NEILL, P. M.; BRAY, P. G.; HAWLEY, S. R.; WARD, S. A.; PARK, B. K. 4-Aminoquinolines - Past, present, and future; A chemical perspective. *Pharmacology & therapeutics*, v.77, n.1, p. 29-58, 1998.

OPAS. Actualización Epidemiológica Aumento de malaria en las Américas. 2018. Disponível em:

https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&view=download&category_slug=2018-9582&alias=43437-30-enero-2018-malaria-actualizacion-epidemiologica-437&Itemid=270&lang=pt. Acesso em: 04/01/2019.

OPAS. Organização Pan-Americana de Saúde, 2016. Disponível em: http://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5287:malaria-2&Itemid=875. Acesso em: 20/09/2017.

OUATTARA, A.; LAURENS, M. B. Vaccines against malaria. *Clinical infectious diseases*, v.60, n.6, p. 930-936, 2014.

PACKARD, R. M. The Origins of Antimalarial-Drug Resistance. *The New England journal of medicine* v. 371, n. 5, p. 397–399, 2014.

PAGANO, M.; FAGGIO, C. The use of erythrocyte fragility to assess xenobiotic cytotoxicity. *Cell biochemistry and function*, v.33, p. 351-355, 2015.

PARHIZGAR, A. R.; TAHGHIGHI, A. Introducing new antimalarial analogues of chloroquine and amodiaquine: a narrative review. *Iranian journal of medical sciences*, v.42, n.2, p.115, 2017.

PARTHIBAN, A.; MUTHUKUMARAN, J.; MANHAS, A.; SRIVASTAVA, K.; KRISHNA, R.; RAO, H. S. P. Synthesis, *in vitro* and *in silico* antimalarial activity of 7-chloroquinoline and 4H-chromene conjugates. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, v.25, n.20, p. 4657 - 4663, 2015.

PATEL, M. M.; PATEL, B. M. Crossing the Blood-Brain Barrier: recent advances in drug delivery to the brain. *CNS Drugs*, v.31, n.2, p. 109 - 133, 2017.

PAYNE, D. Spread of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Parasitology Today* v. 3, n. 8, p. 241–246, 1987.

PEDREIRO, E.S.D. Análise *in silico* de impurezas provenientes da síntese de fármacos: pesquisa de estruturas de alerta de genotoxicidade, mutagenicidade e carcinogenicidade. 2016. Dissertação. (mestrado em Design e Desenvolvimento de Fármacos), Coimbra.

PENG, Y.; YADAVA, P.; HEIKKINEN, A. T.; PARROTT, N.; RAILKAR, A. Applications of a 7-day Caco-2 cell model in drug discovery and development. *European journal of pharmaceutical sciences*, v.56, p.120-130, 2014.

PENNA-COUTINHO, J.; CORTOPASSI, W. A.; OLIVEIRA, A. A.; FRANÇA, T. C. C.; KRETTLI, A. U. Antimalarial activity of potential inhibitors of *Plasmodium falciparum* lactate dehydrogenase enzyme selected by docking studies. *PLoS one*, v,6, n.7,

2011.

PETERS, W. Drug resistance in *Plasmodium berghei*. I. Chloroquine resistance. *Experimental parasitology*, v. 17, n. 1, p. 80-9, 1965.

PHILLIPS, M.A.; BURROWS, J.N.; MANYANDO, C.; HUIJSDUIJNEN, R.H.V.; VOORHIS, W.C.V.; WELLS, T.N.C. Malaria. *Nature reviews disease primers* v. 3, p. 17050, 2017.

PIETERS, R.; HUISMANS, D.R.; LEUVA, A.; VEERMAN, A.J. 1988. Adaptation of the rapid automated tetrazolium dye based (MTT) assay for chemosensitivity testing in childhood leukemia. *Cancer Letters*, v.41, n.3, p. 323-332.

PINA-COSTA, A. D.; BRASIL, P.; SANTI, S. M. D.; ARAUJO, M. P. D.; SUÁREZ-MUTIS, M. C.; SANTELLI, A.C.F.S; OLIVEIRA-FERREIRA, J.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; DANIEL-RIBEIRO, C. T. Malaria in Brazil: what happens outside the Amazonian endemic region. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 109(5), 618-633, 2014.

PINOTTI M, LOBO A.G, DAMASCENO G, SOARES R. Field tests of chloroquin-table salt mixture. *Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais*. V.7, n.1, p. 5-23, 1955.

PRICE, R. N.; CASSAR, C.; BROCKMAN, A.; DURAISINGH, M.; VAN VUGT, M.; WHITE, N. J.; NOSTEN, F.; KRISHNA, S. The *pfmdr1* gene is associated with a multidrug-resistant phenotype in *Plasmodium falciparum* from the western border of Thailand. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v.43, n.12, p. 2943-2949, 1999.

PRUDÊNCIO, M.; MOTA, M.M.; MENDES, A.M. A toolbox to study liver stage malaria. *Trends in Parasitology* v. 27, n. 12, p. 565 - 574, 2011.

RAHARDJO, T.; NURHAYATI, S.; RAMADHANI, D. Liver Histopathological Studies of Mice (*Mus musculus* sp.) Infected with gamma rays irradiated *Plasmodium berghei* strains Anka. *HAYATI Journal of biosciences*, v20, n.3, p.144-150, 2013.

RAMOS JÚNIOR, W. M.; SARDINHA, J. F.; COSTA, M. R.; SANTANA, M. S.; ALECRIM, M. G.; LACERDA, M. V. Clinical aspects of hemolysis in patients with *P. vivax* malaria treated with primaquine, in the Brazilian Amazon. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v.14, n.4, p.410-412, 2010.

RAMOS-SILVA, A.; TAVARES-CARREÓN, F.; FIGUEROA, M.; TORRE-ZAVALA, S.D.L.; GASTELUM-ARELLANEZ, A.; RODRÍGUEZ-GARCÍA, A.; GALÁN-WONG, L.J.; AVILÉS-ARNAUT, H. Anticancer potential of *Thevetia peruviana* fruit methanolic extract. *BMC complementary and alternative medicine*,

v.15, n.241, p.1-11, 2017.

RAUNIO, H.; KUUSISTO, M.; JUVONEN, R. O.; PENTIKÄINEN, O. T. Modeling of interactions between xenobiotics and cytochrome P450 (CYP) enzymes. *Frontiers in pharmacology*, v.6, 123, 2015.

READ, J. A.; WILKINSON, K. W.; TRANTER, R.; SESSIONS, R. B.; BRADY, R. L. Chloroquine binds in the cofactor binding site of plasmodium falciparum lactate dehydrogenase. *Journal of biological chemistry*, v.274, n.15, p.10213-10218, 1999.

RIECKMANN, K. H.; DAVIS, D. R.; HUTTON, D. C. *Plasmodium vivax* resistance to chloroquine? *The Lancet* v. 334, n. 8673, p. 1183–1184, 1989.

RITCHIE, T. J.; ERTL, P.; LEWIS, R. The graphical representation of ADME-related molecule properties for medicinal chemists. *Drug discovery today*, v.16, n.1-2, p. 65–72, 2011.

ROLLAS, Sevim; KÜÇÜKGÜZEL, S. Biological activities of hydrazone derivatives. *Molecules*, v. 12, n. 8, p. 1910-1939, 2007.

SÁ, I. M. D. A resistência à cloroquina e a busca de antimalariais entre as décadas de 1960 e 1980. *História, Ciências, Saúde – Manguinhos* v. 18, n. 2, p. 407–430, 2011.

SALAHUDDIN, A.; INAM, A.; VAN ZYL, R. L.; HESLOP, D. C.; CHEN, C. T.; AVECILLA, F.; AGARWAL, S.M.; AZAM, A. Synthesis and evaluation of 7-chloro-4-(piperazin-1-yl) quinoline-sulfonamide as hybrid antiprotozoal agents. *Bioorganic & medicinal chemistry*, v.21, n.11, p.3080-3089, 2013.

SANNER, M. F. Python: A Programming Language for Software Integration and Development. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, v. 17, n. 1, p. 57-61, 1999.

SARKAR, S.; SIDDIQUI, A. A.; SAHA, S. J.; DE, R.; MAZUMDER, S.; BANERJEE, C.; IQBAL, M.S.; NAG, S.; ADHIKARI, S.; BANDYOPADHYAY, U. Antimalarial activity of small molecule benzothiazole hydrazones. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, AAC-01575, 2016.

SAUNDERS, D. L. Ferroquine Advances. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 97, n. 2, p. 309-310, 2017.

SAWYER, D.R. Frontier malaria in the Amazon region of Brazil: types of malaria situations and some implications for control. Brasília: PAHO/WHO/TDR; 1988.

SCACCABAROZZI, D.; DEROST, K.; CORBETT, Y.; LAYS, N.; CORSETTO, P.; SALÈ, F. O.; VAN DEN STEEN, P.E.; TARAMELLI, D. Differential induction of malaria liver pathology in mice infected with *Plasmodium chabaudi* AS or *Plasmodium berghei* NK65. *Malaria journal*, v.17, n.18, 2018.

SCHLAGENHAUF, P.; KAIN, K.C.; in *Travel Medicine*, Third Edition, 2013

SCHOFIELD, L.; GRAU, G. E. Immunological processes in malaria pathogenesis. *Nature reviews immunology*, v.5, n.9, p. 722-735, 2005.

SCHRÖDINGER. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.9 Schrödinger, LLC, 2015.

SENTHILRAJA1 ,P.; K. KATHIRESAN. In vitro cytotoxicity MTT assay in Vero, HepG2 and MCF -7 cell lines study of Marine Yeast. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, v. 5, n.3, p. 080-084, 2015.

SHARMA, M.; CHAUHAN, K.; SRIVASTAVA, R. K.; SINGH, S. V.; SRIVASTAVA, K.; SAXENA, J. K.; PURI, S.K.; CHAUHAN, P. M. Design and Synthesis of a New Class of 4-Aminoquinolinyl-and 9-Anilinoacridinyl Schiff Base Hydrazones as Potent Antimalarial Agents. *Chemical biology & drug design*, v.84, n.2, p. 175-181, 2014.

SHERMAN, I. W. Amino acid metabolism and protein synthesis in malarial parasites. *Bulletin of the World Health Organization* v. 55, n. 2–3, p. 265–76, 1977.

SHI, L.; GE, H.M.; TAN, S.H.; LI, H.Q.; SONG, Y.C.; ZHU, H.L.; TAN, R.X. Synthesis and antimicrobial activities of Schiff bases derived from 5-chloro-salicylaldehyde. *European Journal of Medicinal Chemistry*; v.42, p.558–564, 2007.

SHITTU, I. I.; EMMANUEL, A.; NOK, A. J. Antimalaria effect of the ethanolic stem bark extracts of *Ficus platyphylla* del. *Journal of parasitology research*, 2011.

SHOEMARK, D. K.; CLIFF, M. J.; SESSIONS, R. B.; CLARKE, A. R. Enzymatic properties of the lactate dehydrogenase enzyme from *Plasmodium falciparum*. *The FEBS journal*, v.274, n.11, p.2738-2748, 2007.

SIJWALI, P. S.; ROSENTHAL, P. J. Gene disruption confirms a critical role for the cysteine protease falcipain-2 in hemoglobin hydrolysis by *Plasmodium falciparum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* v. 101, n. 13, p. 4384–4389, 2004.

SINAN/SVS/MS, SIVEL-MALÁRIA. Mapa de risco de malaria por município brasil, 2017: <http://portal.arquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/abril/16/Mapa-de-risco-mal--ria-2017.pdf> acesso 27/05/2018.

SINGH, S. K.; HORA, R.; BELRHALI, H.; CHITNIS, C. E.; SHARMA, A. Structural basis for Duffy recognition by the malaria parasite Duffy-binding-like domain. *Nature*, v.439, n.7077, p. 741-744, 2006.

SKOROKHOD, O. A.; ALESSIO, M.; MORDMULLER, B.; ARESE, P.,; SCHWARZER, E.; Hemozoin (Malarial Pigment) Inhibits Differentiation and Maturation of Human Monocyte-Derived Dendritic Cells: A Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- α -Mediated Effect. *The Journal of Immunology*, v.173, n.6, p.4066–4074, 2004.

SOARES, R. R.; DA SILVA, J. M. F.; CARLOS, B. C.; DA FONSECA, C. C.; DE SOUZA, L. S. A.; LOPES, F. V.; DIAS, R.M.P.; MOREIRA, P.O.L.; ABRAMO, C.; VIANA, G.H.R.; VAROTTI, F.P.; DA SILVA, A.D., SCOPEL, K.K.G. New quinoline derivatives demonstrate a promising antimalarial activity against *Plasmodium falciparum in vitro* and *Plasmodium berghei in vivo*. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, v. 25, n.11, p.2308-2313, 2015.

SOLOMON, V. R.; HAQ, W.; SRIVASTAVA, K.; PURI, S. K.; KATTI, S. B. Synthesis and antimalarial activity of side chain modified 4-aminoquinoline derivatives. *Journal of medicinal chemistry*, v.50, n.2, p. 394-398, 2007.

STECK, E. A. *The Chemotherapy of Protozoan Diseases*, v. 3, n.4. Walter Reed Army Institute of Research, Washington, DC, 1972.

STURM, A.; GRAEWE, S.; FRANKE-FAYARD, B.; RETZLAFF, S.; BOLTE, S.; ROPPENSER, B.; AEPFELBACHER, M.; JANSE, C.; HEUSSLER, V. Alteration of the parasite plasma membrane and the parasitophorous vacuole membrane during exo-erythrocytic development of malaria parasites. *Protist*, v.160, n.1, p. 51-63, 2009.

SULLIVAN, D. J.; MATILE, H.; RIDLEY, R. G.; GOLDBERG, D. E. A common mechanism for blockade of heme polymerization by antimalarial quinolines. *Journal of biological chemistry*, v. 273, n.47, p. 31103-31107, 1998.

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.

TEGAR, M.; PURNOMO, H. Tea leaves extracted as anti-malaria based on molecular docking plants. *Procedia environmental sciences*, v.17, p.188-194, 2013.

THI, T.L.; XUAN, T.H.; DINH, H.V., KHAC V.T. Design, synthesis and in vitro antimalarial evaluation of new quinolinyldiazone derivatives. *Letters in Drug Design & Discovery*, v.9, n.2, 163-168, 2012.

THUY, L.T.; TIEN, H. X.; HOANG, V.D.; VU, T.K. Design, synthesis and in vitro antimalarial evaluation of new quinolinyldrazone derivatives. *Letters in Drug Design e Discovery*, v.9, n.2, p.163-168, 2012.

TICKELL-PAINTER, M.; SAUNDERS, R.; MAAYAN, N.; LUTJE, V.; MATEO-URDIALES, A.; GARNER, P. Deaths and parasuicides associated with mefloquine chemoprophylaxis: a systematic review. *Travel medicine and infectious disease*, 20, 5-14, 2017.

TRAGER, W.; JENSEN, J.B. 1976. Human malaria parasites in continuous culture. *Science*, v. 193, n. 4254, 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*, 2009.

VAN DER ZEE, J.; BARR, D. P.; MASON, R. P. ESR spin trapping investigation of radical formation from the reaction between hematin and tert-butyl hydroperoxide. *Free radical biology and medicine* v. 20, n. 2, p. 199–206, 1996.

VIRIYAVEJAKUL, P.; KHACHONSAKSUMET, V.; PUNSAWAD, C. Liver changes in severe *Plasmodium falciparum* malaria: histopathology, apoptosis and nuclear factor kappa B expression. *Malaria journal*, v. 13, n. 1, p. 106, 2014.

WADOOD, A.; AHMED, N.; SHAH, L.; AHMAD, A.; HASSAN, H.; SHAMS, S. In-silico drug design: An approach which revolution arised the drug discovery process. *OA Drug Design & Delivery*, 1, p.1-3, 2013.

WANI, W. A.; JAMEEL, E.; BAIG, U.; MUMTAZUDDIN, S.; HUN, L. T. Ferroquine and its derivatives: new generation of antimalarial agents. *European journal of medicinal chemistry*, v.101, p. 534-551, 2015.

WARHURST, D. C.; ADAGU, I. S.; BECK, H. P.; DURAISINGH, M. T.; KIRBY, G. C.; VON SEIDLEIN, L.; WRIGHT, C. W. Mode of action of artemether lumefantrine (COARTEM): The sole, fixed, oral ADCC and its role in combatting multidrug resistance. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*, v. 32(suppl. 1), p. 4-8, 2001.

WASSMER, S.M.; GRAU, G.E. Severe malaria: what's new on the pathogenesis front? *International journal for parasitology*. V.47, n.2–3, p.145–152, 2017.

WELLEMS, T. E.; PLOWE, C. V. Chloroquine-resistant malaria. *The Journal of infectious diseases*, v. 184, n. 6, p. 770-776, 2001.

WHITE, N. J. Qinghaosu (Artemisinin): The Price of Success. *Science* v. 320, n. 5874, p. 330–334, 2008.

WHITE, N. J.; PUKRITTAYAKAMEE, S.; HIEN, T.T; FAIZ, M.A.; MOKUOLU, O.L.; DONDORP, A.M. 2014. *Malaria*. *The lancet*, v. 383, n. (9918); p. 723–735, 2014.

WHITE, N.J. Determinants of relapse periodicity in *Plasmodium vivax* malaria. *Malaria Journal*, v. 10, n. 1, p. 297, 2011.

WHO. World Health Organization Disponível em:
<https://www.who.int/malaria/areas/treatment/overview/en/> Acesso em: 11/01/19.

WILAIRATANA, P.; LOOAREESUWAN, S.; CHAROENLARP, P. Liver profile changes and complications in jaundiced patients with falciparum malaria. *Tropical medicine and parasitology: official organ of Deutsche Tropenmedizinische Gesellschaft and of Deutsche Gesellschaft fur Technische Zusammenarbeit (GTZ)*, v. 45, n. 4, p. 298-302, 1994.

WILSON, K.; FLANAGAN, K.; PRAKASH,; M.; PLEBANSKI, M. Malaria vaccines in the eradication era: current status and future perspectives. *Expert Review of Vaccines*, 2019.

WONG,W.; BAI, X.C.; SLEEBBS, B.E.; TRIGLIA,T.; BROWN, A.; THOMPSON ,J.K.; JACKSON, K.E.; HANSEN, E.; MARAPANA, D.S.; FERNANDEZ, I.S.; RALPH, S.A.; COWMAN, A.F.; SCHERES, S.H.W., BAUM, J. Mefloquine targets the *Plasmodium falciparum* 80S ribosome to inhibit protein synthesis. *Nature microbiology* v.2, p.17031, 2017.

WOODBERRY, T., LOUGHLAND, J. R., MINIGO, G., BUREL, J. G., AMANTE, F. H., PIERA, K. A.; MC NEIL, Y.; YEO, T.W.; GOOD, M.F.; DOOLAN,, D.L.; ENGWERDA, C. R.; MCCARTHY, J.S.; ANSTEYA, N.M. Early immune regulatory changes in a primary controlled human *Plasmodium vivax* infection: CD1c+ myeloid dendritic cell maturation arrest, induction of the kynurenine pathway, and regulatory T cell activation. *Infection and immunity*, v. 85, n.6, 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2011. Eliminating malaria: learning from the past, looking ahead. Disponível em:
https://www.path.org/publications/files/MCP_rbm_pi_rpt_8.pdf. Acesso: 22/10/2017.

WORLD MALARIA REPORT. 2014. World Health Organization. Disponível em:
https://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2014/report/en/Acesso o: 28.01.2019

WORLD MALARIA REPORT. 2016. World Health Organization. Disponível em:

<http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2016/report/en/> Acesso: 23.10.2017

WORLD MALARIA REPORT. 2017. World Health Organization. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/259492/9789241565523-eng.pdf?sequence=1> Acesso em: 08/01/2019.

WORLD MALARIA REPORT. 2018. World Health Organization. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/275867/9789241565653-eng.pdf?ua=1> Acesso em: 08/01/2019.

WUNDERLICH, J.; ROHRBACH, P.; DALTON, J. P. The malaria digestive vacuole. *Frontiers in bioscience*, v. 4, p. 1424-1448, 2012.

YAM, X. Y.; PREISER, P. R. Host immune evasion strategies of malaria blood stage parasite. *Molecular biosystems*, v.13, n.12, p. 2498-2508, 2017.

YANG, C. Y.; CAI, S. J.; LIU, H.; PIDGEON, C. Immobilized artificial membranes - screens for drug membrane interactions. *Advanced drug delivery reviews*, v.23, n.1-3, p. 229-256, 1997.

ZANGER, U. M.; SCHWAB, M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacology & therapeutics*, v.138, n.1, p. 103-141, 2013.

ZHANG, Y.; HEMPELMANN, E. 1987. Lysis of malarial parasites and erythrocytes by ferriprotoporphyrin IX-chloroquine and the inhibition of this effect by proteins. *Biochemical pharmacology*, v.15; n. 36(8), p. 1267-1273.

ZHOU, S.F. Drugs behave as substrates, inhibitors and inducers of human cytochrome P450 3A4. *Current drug metabolism*, v. 9, n. 4, p. 310-322, 2008.

ANEXO 1

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISAS COM SERES HUMANOS.



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação da citotoxicidade de compostos com potencial atividade antimalárica em eritrócitos humanos

Pesquisador: CLARICE ABRAMO

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 64380016.9.0000.5147

Instituição Proponente: Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia/UFJF

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.160.565

Apresentação do Projeto:

No presente projeto será preciso avaliar a toxicidade de novos compostos químicos, derivados do anel quinolínico da cloroquina, em hemácias humanas, e também será preciso utilizar hemácias humanas para o cultivo do parasito Plasmodium falciparum "in vitro". Para isso será feita a coleta de sangue por punção venosa de doadores saudáveis e adulto. O sangue do doador será utilizado exclusivamente para avaliar a toxicidade das drogas testadas e para manter o parasito em cultura. Apresentação do projeto esta clara, detalhada de forma objetiva, descreve as bases científicas que justificam o estudo, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/12 de 2012, item III.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar a atividade antimalárica e citotóxica de novos compostos in vitro.

Objetivo Secundário:

- Avaliar a toxicidade in vitro dos compostos por ensaio de hemólise, utilizando eritrócitos humanos.- Avaliar a atividade antimalárica de novos compostos in vitro em eritrócitos humanos infectados por P. falciparum.

O Objetivo da pesquisa está bem delineado, apresenta clareza e compatibilidade com a proposta,

Endereço: JOSE LOURENCO KELMER S/N
Bairro: SAO PEDRO **CEP:** 36.036-900
UF: MG **Município:** JUIZ DE FORA
Telefone: (32)2102-3788 **Fax:** (32)1102-3788 **E-mail:** cep.propesq@uffj.edu.br



Continuação do Parecer: 2.160.565

tendo adequação da metodologia aos objetivos pretendido, de acordo com as atribuições definidas na Norma Operacional CNS 001 de 2013, item 3.4.1 - 4.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O procedimento é considerado de risco mínimo ao participante, pois para a coleta de sangue será utilizado materiais devidamente estéreis e será realizado por profissional habilitado. A malária é uma doença grave que mata milhares de pessoas por ano. Um dos grandes problemas da malária é o surgimento de resistência do parasito aos medicamentos atualmente disponíveis. A pesquisa visa a descoberta de novos antimaláricos que sejam seguros e eficazes, driblando a resistência adquirida pelo parasito aos antimaláricos disponíveis no mercado. Riscos e benefícios descritos em conformidade com a natureza e propósitos da pesquisa. O risco que o projeto apresenta é caracterizado como risco mínimo, considerando que os indivíduos não sofrerão qualquer dano ou sofrerão prejuízo pela participação ou pela negação de participação na pesquisa e benefícios esperados estão adequadamente descritos. A avaliação dos Riscos e Benefícios estão de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/12 de 2012, itens III; III.2 e V.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto está bem estruturado, delineado e fundamentado, sustenta os objetivos do estudo em sua metodologia de forma clara e objetiva, e se apresenta em consonância com os princípios éticos norteadores da ética na pesquisa científica envolvendo seres humanos elencados na resolução 466/12 do CNS e com a Norma Operacional N° 001/2013 CNS.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O protocolo de pesquisa está em configuração adequada, apresenta FOLHA DE ROSTO devidamente preenchida, com o título em português, identifica o patrocinador pela pesquisa, estando de acordo com as atribuições definidas na Norma Operacional CNS 001 de 2013 item 3.3 letra a; e 3.4.1 item 16. Apresenta o TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO em linguagem clara para compreensão dos participantes, apresenta justificativa e objetivo, campo para identificação do participante, descreve de forma suficiente os procedimentos, informa que uma das vias do TCLE será entregue aos participantes, assegura a liberdade do participante recusar ou retirar o consentimento sem penalidades, garante sigilo e anonimato, explicita riscos e desconfortos esperados, indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa, contato do pesquisador e do CEP e informa que os dados da pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador pelo período de cinco anos, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466 de 2012, itens: IV letra b; IV.3 letras a,b,d,e,f,g e h; IV. 5 letra d e XI.2 letra f. Apresenta o

Endereço: JOSE LOURENCO KELMER S/N
 Bairro: SAO PEDRO CEP: 36.036-900
 UF: MG Município: JUIZ DE FORA
 Telefone: (32)2102-3788 Fax: (32)1102-3788 E-mail: cep.propesq@uffj.edu.br



Continuação do Parecer: 2.160.565

INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS de forma pertinente aos objetivos delineados e preserva os participantes da pesquisa. O Pesquisador apresenta titulação e experiência compatível com o projeto de pesquisa, estando de acordo com as atribuições definidas no Manual Operacional para CPEs. Apresenta DECLARAÇÃO de infraestrutura e de concordância com a realização da pesquisa de acordo com as atribuições definidas na Norma Operacional CNS 001 de 2013 item 3.3 letra h.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto, o projeto está aprovado, pois está de acordo com os princípios éticos norteadores da ética em pesquisa estabelecido na Res. 466/12 CNS e com a Norma Operacional N° 001/2013 CNS. Data prevista para o término da pesquisa: Dezembro de 2018.

Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa CEP/UFJF, de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 466/12 e com a Norma Operacional N°001/2013 CNS, manifesta-se pela APROVAÇÃO do protocolo de pesquisa proposto. Vale lembrar ao pesquisador responsável pelo projeto, o compromisso de envio ao CEP de relatórios parciais e/ou total de sua pesquisa informando o andamento da mesma, comunicando também eventos adversos e eventuais modificações no protocolo.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_803679.pdf	06/07/2017 12:00:42		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.doc	06/07/2017 11:56:58	CLARICE ABRAMO	Aceito
Outros	CV.pdf	06/07/2017 11:55:24	CLARICE ABRAMO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEBio.doc	06/07/2017 11:54:21	CLARICE ABRAMO	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico /	DeclBiorrepositorio.pdf	05/06/2017 08:56:18	CLARICE ABRAMO	Aceito

Endereço: JOSE LOURENCO KELMER S/N
 Bairro: SAO PEDRO CEP: 36.036-900
 UF: MG Município: JUIZ DE FORA
 Telefone: (32)2102-3788 Fax: (32)1102-3788 E-mail: cep.propesq@ufjf.edu.br



Continuação do Parecer: 2.160.565

Biorepositório / Biobanco	DeclBiorrepositorio.pdf	05/06/2017 08:56:18	CLARICE ABRAMO	Aceito
Folha de Rosto	FolhaderostoClarice.pdf	05/06/2017 08:53:56	CLARICE ABRAMO	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

JUIZ DE FORA, 06 de Julho de 2017

Assinado por:
Patricia Aparecida Fontes Vieira
(Coordenador)

Endereço: JOSE LOURENCO KELMER S/N
Bairro: SAO PEDRO **CEP:** 36.036-900
UF: MG **Município:** JUIZ DE FORA
Telefone: (32)2102-3788 **Fax:** (32)1102-3788 **E-mail:** cep.propesq@ufjf.edu.br

ANEXO 2**PROTOCOLO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISAS COM ANIMAIS
(ANIMAIS DE MANUTENÇÃO)**

**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA**

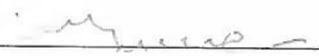
CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo nº. 042/2016 – CEUA sobre “Manutenção da cepa de plasmodium berghei em camundongos”, projeto de pesquisa sob a responsabilidade de Clarice Abramo está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF, em reunião realizada em 10/01/2017. Para o desenvolvimento da pesquisa serão utilizados 60 fêmeas de Camundongos heterogênicos Swiss de 4-6 semanas de idade, conforme solicitado e que serão utilizados no período 20/04/2017 a 31/10/2017.

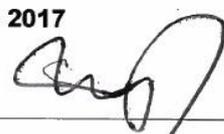
CERTIFICATE

We certify that the protocol nº. 042/2016 – CEUA about “Manutenção da cepa de plasmodium berghei em camundongos” under responsibility of Clarice Abramo is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF – ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL HANDLING (CEUA) in 10/01/2017. For the development of this research 60 females of Swiss heterogenic mice of 4-6 weeks of age, will be delivered as requested in the period of 20/04/2017 to 31/10/2017.

Juiz de Fora, 11 de abril de 2017



Vice-coordenadora
CEUA



Coordenadora
CEUA

ANEXO 3**PROTOCOLO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISAS COM ANIMAIS
(ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO)**

**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA**

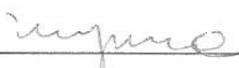
CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo nº. 043/2016 – CEUA sobre “Avaliação da atividade antimalária de novos compostos sintéticos derivados de aminoquinolinas em modelo murino infectado com Plasmodium berghei- planejamento para 2017”, projeto de pesquisa sob a responsabilidade de Clarice Abramo está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF, em reunião realizada em 10/01/2017. Para o desenvolvimento da pesquisa serão utilizados 120 fêmeas de Camundongos heterogênicos Swiss de 4-6 semanas de idade, conforme solicitado e que serão utilizados no período 20/04/2017 a 31/10/2017.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº. 043/2016 – CEUA about “Manutenção da cepa de plasmodium berghei em camundongos” under responsibility of Clarice Abramo is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF – ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL HANDLING (CEUA) in 10/01/2017. For the development of this research 120 females of Swiss heterogenic mice of 4-6 weeks of age, will be delivered as requested in the period of 20/04/2017 to 31/10/2017.

Juiz de Fora, 11 de abril de 2017



Vice-coordenadora
CEUA



Coordenadora
CEUA

ANEXO 4**PRORROGAÇÃO DO PRAZO DO PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA
EM PESQUISA COM ANIMAIS**

**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA**

Mem. 009/2018/ CEUA

Juiz de Fora, 05 de abril de 2018

De: Coordenação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFJF)

Para: Profª Drª Clarice Abramo

Assunto: Protocolo 43/2016

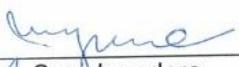
Prezada Pesquisadora,

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFJF), da Universidade Federal de Juiz de Fora, em reunião realizada em 03/04/2018 analisou a solicitação de alteração nas datas de início e término do Protocolo 43/2016 intitulado "Avaliação da atividade antimalária de novos compostos sintéticos derivados de aminoquinolinas em modelo murino infectado com *Plasmodium berghei*-planejamento para 2017", e emitiu o seguinte parecer;

- Permissão da extensão de prazo para início em 20/04/2018 e prazo de término para 30/04/2018.

Atenciosamente,

Comissão de Ética no Uso de Animais



Coordenadora
CEUA



Vice-Coordenadora
CEUA