

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E DOENÇAS INFECTO-PARASITÁRIAS,  
GENÉTICA E BIOTECNOLOGIA**

Fernanda Valério Lopes

Avaliação da atividade antimalárica e citotóxica de compostos derivados de 1,2,3-  
triazóis em modelo murino

Juiz de Fora

2017

Fernanda Valério Lopes

Avaliação da atividade antimalárica e citotóxica de compostos derivados de 1,2,3-triazóis em modelo murino

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Área: Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas: Área: Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Clarice Abramo

Co-orientador: Prof. Dr. Adilson David da Silva

Juiz de Fora

2017

**Fernanda Valério Lopes**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMALÁRICA E CITOTÓXICA DE  
COMPOSTOS DERIVADOS DE 1,2,3-TRIAZÓIS EM MODELO  
MURINO**

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Área: Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas: Área: Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias.

Aprovado em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Banca Examinadora

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Clarice Abramo  
Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia – UFJF

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Fabíola Dutra Rocha  
Departamento de Farmacognosia – UFJF

---

Prof. Dr. Fernando de Pilla Varotti  
Núcleo de Pesquisa em Química Biológica – UFSJ

*Dedico este trabalho à minha mãe,  
meu maior exemplo na vida de  
amor, dedicação e persistência.*

## AGRADECIMENTOS

Aos meus amados pais, irmãos, Artur e toda minha família pelo apoio e incentivo ao longo dessa jornada.

À minha orientadora Profa. Clarice Abramo, pelas grandes oportunidades concedidas, confiança, orientação e ensinamentos que muito contribuíram para minha formação acadêmica.

Ao meu co-orientador Prof. Adilson e seu aluno Pedro Fazza, que fizeram parte da realização deste projeto e sempre estiveram disponíveis quando necessário.

À professora Priscila Capriles e sua aluna Lara Azevedo, que colaboraram com os estudos realizados neste trabalho.

Às professoras do Departamento de Parasitologia, Kézia, Florence e Elaine, pela convivência e pelos ensinamentos.

Aos colegas que passaram pelo grupo da Malária ao longo desses anos, Maiza, Mariana Bolotari, Bianca, Juliane, Vanessa, Jean, Taianne, Carol, Maria Emília, por todos os ensinamentos e agradáveis momentos compartilhados. Em especial à Roberta, por todo apoio e incentivo, essenciais durante essa trajetória.

Às demais colegas do Laboratório de Parasitologia, em especial à Luciana e Patrícia pelos inúmeros ensinamentos e ajudas ao longo de todos esses anos.

A Deus por ter iluminado meus caminhos, me dando sempre saúde e determinação para realização de meus objetivos.

À CAPES, CNPq e UFJF pelo financiamento ao projeto.

## RESUMO

A malária continua sendo uma das doenças infecciosas mais preocupantes do mundo, afetando principalmente áreas tropicais com altas taxas de mortalidade entre crianças menores de 5 anos e mulheres grávidas. Estima-se que 2015 ocorreram 212 milhões de novos casos de malária e 429.000 mortes, sendo a Região Africana a mais afetada, com cerca de 90% dos casos de malária. O aumento do número de cepas de *Plasmodium* multirresistentes levou o tratamento atualmente disponível para a malária a se tornar menos eficaz. Portanto, o desenvolvimento de novas drogas com diferentes mecanismos de ação é necessário para superar a resistência dos parasitos. Derivados de triazóis exibem várias atividades biológicas descritas, tais como analgésico, antibacteriano, fungicida, anti-inflamatório, anti-hipertensivo, antiviral e antitumoral. 1,2,3-triazol, em geral, são estáveis em ambientes ácidos e básicos e formam ligações de hidrogênio podendo atuar favorecendo a ligação de moléculas em alvos biomoleculares, sendo uma porção promissora para a síntese de novos compostos com ação biológica. Este estudo tem como objetivo avaliar a atividade antimalárica de derivados de 1,2,3-triazóis. Estudos farmacocinéticos preliminares dos compostos foram feitos com base na regra dos cinco de Lipinski utilizando o programa Molsoft. Todos os derivados demonstraram boas propriedades físico-químicas para serem avaliadas *in vivo*. Para avaliar a citotoxicidade *in vitro* foram utilizadas culturas primárias de macrófagos peritoneais murinos. A viabilidade celular foi determinada por ensaio MTT. A toxicidade *in vitro* também foi determinada por ensaio de hemólise em eritrócitos humanos. Alguns compostos mostraram-se relativamente tóxicos quando avaliados pelo ensaio de MTT, mas no teste de hemólise a maioria dos compostos não mostrou toxicidade contra os eritrócitos. A atividade antimalárica *in vivo* dos compostos foi avaliada utilizando camundongos infectados com *Plasmodium berghei* NK65. Os compostos foram testados a 10 mg / kg utilizando o teste supressivo de 4 dias descrito por Peters (modificado). Esfregaços de sanguíneos foram utilizados para obter a inibição da multiplicação do parasito e determina a atividade dos compostos. Todos os 9 compostos avaliados exibiram atividade antimalárica *in vivo*, atingindo porcentagens de supressão acima de 30% até 9 dias após a infecção. Os compostos (1), (4), (5) e (6) mostraram atividades promissoras, com supressão de parasitemia maior que 50% na maioria dos casos. Todos estes compostos têm em comum a presença de uma cadeia de 10 átomos de carbono ligada à posição 1 do anel triazólico, que pode estar relacionada com a melhor atividade dos compostos. Foram realizados estudos de docking molecular para determinar se a enzima pLDH era o alvo de ação dos derivados. Os resultados obtidos mostraram que estudos adicionais ainda devem ser realizados para determinar o alvo de ação dos compostos. Os resultados promissores sugerem que as moléculas devem exigir mais pesquisas, com o objetivo de fornecer novos antimaláricos.

## ABSTRACT

Malaria remains one of the most worrying infectious diseases in the world, affecting mainly tropical areas with high rates of mortality among children under 5 years and pregnant woman. Estimated that 2015 occurred 212 million new cases of malaria, and 429 000 deaths. About 90% of malaria cases are estimated to have occurred in the WHO African Region. The increase of the number of multidrug-resistant *Plasmodium* strains becoming less effective the treatment currently available for malaria. Therefore, the development of new drugs with different mechanisms of action is necessary to overcome parasites resistance. Triazole derivatives are reported to exhibit several biological activities such as analgesic, antibacterial, fungicidal, anti-inflammatory, antihypertensive, antiviral and antitumor. 1,2,3-triazole, in general, are stable under acidic and basic environments and form hydrogen bonds with biomolecular targets. Thus, triazoles provide a moiety which is promising from the perspective of synthetic strategy, and can also be advantageous biologically. This study aims to evaluate the antimalarial activity of derivatives of 1,2,3-triazoles. Preliminary pharmacokinetics studies of the compounds have been made based on the Lipinski Rule of Five using the Molsoft program. All derivatives have demonstrated good pharmacokinetic properties to be evaluated *in vivo*. To evaluate *in vitro* cytotoxicity was used primary cultures of murine peritoneal macrophages. Cell viability was determined by MTT assay. Toxicity *in vitro* was also determined by hemolysis assay against human erythrocytes. Some compounds showed relatively toxic when evaluated by MTT assay but in hemolysis test most compounds showed no toxicity against RBCs. *In vivo* antimalarial activity of ten compounds were evaluated using mice infected with *Plasmodium berghei* NK65. The compounds were tested at 10mg/kg using the 4-day suppressive test described by Peters (modified) and blood smears were used to obtain the inhibition of parasite multiplication. All 9 compounds evaluated exhibited antimalarial activity, reaching percentages of suppression above 30% until 9 days post-infection. Compounds (1), (4), (5) and (6) showed promising activities, with parasitaemia suppression greater than 50% in most cases. All of these compounds have in common the presence of a 10-carbon chain attached to the 1-position of the triazole ring, which may be related to the better activity of the compounds. Molecular docking studies were performed to determine whether the pLDH enzyme was the action target of the derivatives and showed that further studies should be performed to determine the action target. These results suggest that the molecules should require further researches, with the aim of provide new antimalarials.

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1</b> - Distribuição dos casos confirmados de malária no mundo. Fonte: WHO, 2014 (adaptado).....  | 16 |
| <b>Figura 2</b> - Distribuição dos casos confirmados de malária (por 1000 habitantes) no Brasil. Fonte: WHO, 2015 (adaptado). ....  | 17 |
| <b>Figura 3</b> - Ciclo biológico do <i>Plasmodium</i> no hospedeiro humano e no vetor <i>Anopheles</i> . Fonte: GREENWOOD et al., 2008 (adaptado – tradução livre).....  | 19 |
| <b>Figura 4</b> - Fórmula estrutural das 4-aminoquinolinas. Fonte: BURROWS et al., 2014 (adaptado).....   | 25 |
| <b>Figura 5</b> - Fórmula estrutural da primaquina. Fonte: BURROWS et al., 2014 (adaptado).....   | 25 |
| <b>Figura 6</b> - Fórmula estrutural dos aril-aminoálcoois. Fonte: BURROWS et al., 2014 (adaptado).....   | 26 |
| <b>Figura 7</b> - Fórmula estrutural dos antifolatos. Fonte: BURROWS et al., 2014 (adaptado).....   | 27 |
| <b>Figura 8</b> - Fórmula estrutural da artemisinina e seus derivados. Fonte: BURROWS et al., 2014 (adaptado). ....   | 28 |
| <b>Figura 9</b> - Estrutura de 1,2,3-triazol. Fonte: Própria autora. ....   | 31 |
| <b>Figura 10</b> - Atividade hemolítica dos derivados de 1,2,3-triazol e CQ, nas concentrações de 4,7; 9,4; 18,7; 37,5; 75 e 150 µM, frente a hemácias humanas não infectadas. Resultado representado em média ± desvio padrão.....                   | 46 |
| <b>Figura 11</b> - Média das parasitemias nos grupos tratados com sais derivados de 1,2,3-triazóis 1,3,4-trissubstituídos, nos dias pós-infecção. n = 5 camundongos por grupo (exceto grupo do composto (9) onde n = 4 camundongos). * p < 0,05. .... | 47 |

- Figura 12** - Supressão da parasitemia dos camundongos infectados com *P. berghei* e tratados com derivados de 1,2,3-triazóis e com CQ. n = 5 camundongos por grupo (exceto grupo do composto (9) onde n = 4 camundongos). .....50
- Figura 13** - Estrutura tridimensional da enzima LDH de *P. berguei* contendo o substrato oxamato e cofator NAD, obtidos pelo programa PyMOL versão 1.4.1. ....52
- Figura 14** - Representação gráfica do docking molecular entre a *Pb*LDH, o cofator NAD e os compostos (5), (8) e (9). Figura gerada pelo PyMOL versão 1.4.1. ....52
- Figura 15** - Representação do docking molecular entre os compostos e a enzima *Pb*LDH. (A) Composto (5); (B) Composto (6); (C) Composto (8) e (D) Composto (9). Figura gerada pelo PyMOL versão 1.4.1.....54

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabela 1</b> - Estrutura e classificação química dos compostos derivados de 1,2,3-triazol.....   | 36 |
| <b>Tabela 2</b> - Previsão teórica da solubilidade e permeabilidade de derivados de 1,2,3-triazóis.....   | 43 |
| <b>Tabela 3</b> - Atividade citotóxica de derivados de 1,2,3-triazóis utilizando macrófagos peritoneais murinos, avaliada no ensaio de MTT.....     | 44 |
| <b>Tabela 4</b> - Atividade hemolítica de derivados de 1,2,3-triazóis utilizando eritrócitos humanos em ensaio de hemólise.....                     | 45 |
| <b>Tabela 5</b> - Inibição da multiplicação do parasito nos grupos de camundongos tratados com derivados de 1,2,3-triazóis na dose de 10 mg/Kg..... | 48 |
| <b>Tabela 6</b> - Sobrevida dos camundongos infectados por grupo.....   | 51 |
| <b>Tabela 7</b> - Resultados do docking molecular entre a enzima <i>PbLDH</i> e os compostos (5), (6), (8) e (9).....                               | 53 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                  |  |
|------------------|--|
| ACT              | <i>Artemisinin Combination Therapies</i> (Terapias combinadas de artemisinina) |
| CBR              | Centro de Biologia da Reprodução   |
| CC <sub>50</sub> | Concentração citotóxica 50%  |
| CEUA             | Comissão de Ética no Uso de Animais  |
| CQ               | Cloroquina   |
| CSP              | <i>Circumsporozoite protein</i> (Proteína circunsporozoíto)                    |
| DHFR             | Di-hidrofolato redutase  |
| DHPS             | Di-hidropteroato sintase   |
| DMSO             | Dimetilsulfóxido   |
| DDT              | Dicloro-difeniltricloroetano   |
| DP               | Desvio padrão  |
| FDA              | <i>Food and Drug Administration</i>  |
| FP-IX            | Ferriprotoporfirina IX   |
| CH <sub>50</sub> | Concentração hemolítica 50%  |
| HSPG             | <i>Heparan Sulfate Proteoglycan</i> (Proteoglicanos de Sulfato de Heparano)    |
| IMP              | Inibição da Multiplicação do Parasito  |
| i.p.             | Intraperitoneal  |
| MS               | Ministério da Saúde  |
| MSP1             | <i>Merozoite Surface Protein-1</i> (Proteína 1 de superfície dos merozoítos)   |
| MTT              | 3-(4-5-dimetiltiazol-2-il)-2-5 difenil tetrazólico                             |
| ODS              | Objetivos de Desenvolvimento Sustentável                                       |
| OMS              | Organização Mundial de Saúde   |
| ONU              | Organização das Nações Unidas  |

|        |  |
|--------|--|
| PABA   | Ácido paraminobenzóico   |
| PBS    | <i>Phosphate Buffer Saline</i> (Solução salina)  |
| PfCRT  | <i>Plasmodium falciparum Chloroquine Resistance Transporter</i><br>(Transportador de resistência à cloroquina) |
| PfMDR1 | <i>Plasmodium falciparum multi-drug resistance 1</i> (Transportador de resistência a multidrogas tipo 1)       |
| p.i.   | Pós infecção   |
| pLDH   | Lactato desidrogenase plasmodial   |
| PNCM   | Programa Nacional de Controle da Malária   |
| PvMDR1 | <i>Plasmodium vivax multi-drug resistance 1</i> (Transportador de resistência a multidrogas tipo 1)            |
| rpm    | Rotações por minuto  |
| RPMI   | <i>Roswell Park Memorial Institute</i> (Meio de cultura)   |
| SBF    | Soro Bovino Fetal  |
| SIDA   | Síndrome da Imunodeficiência Adquirida   |
| SVS    | Secretaria de Vigilância em Saúde  |
| WHO    | <i>World Health Organization</i> (Organização Mundial de Saúde)  |
| WRAIR  | <i>Walter Reed Army Institute of Research</i> (Instituto de Pesquisas do Exército Walter Reed)                 |

# SUMÁRIO

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO</b> .....   | <b>15</b> |
| <b>1.1 MALÁRIA</b> .....   | <b>15</b> |
| 1.1.1 Epidemiologia.....   | 15        |
| 1.1.2 Transmissão e Patogenia.....   | 18        |
| <b>1.2 O TRATAMENTO ANTIMALÁRICO</b> .....                                 | <b>23</b> |
| 1.2.1 Resistência aos antimaláricos.....                                   | 29        |
| <b>1.3 BUSCA POR NOVOS ANTIMALÁRICOS</b> .....                             | <b>30</b> |
| 1.3.1 Triazóis.....  | 31        |
| <br>   |           |
| <b>2.JUSTIFICATIVA</b> .....   | <b>33</b> |
| <br>   |           |
| <b>3. OBJETIVOS</b> .....  | <b>34</b> |
| 3.1 OBJETIVO GERAL.....  | 34        |
| 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....   | 34        |
| <br>   |           |
| <b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....  | <b>35</b> |
| <b>4.1 COMPOSTOS QUÍMICOS ANALISADOS</b> .....                             | <b>35</b> |
| 4.1.1 Solubilização dos compostos para testes <i>in vivo</i> .....         | 35        |
| 4.1.2 Solubilização dos compostos para testes <i>in vitro</i> .....        | 35        |
| <b>4.2 ANÁLISE DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS <i>in silico</i></b> ..... | <b>36</b> |
| <b>4.3 TESTES DE TOXICIDADE <i>in vitro</i></b> .....                      | <b>37</b> |
| 4.3.1 Citotoxicidade em macrófagos.....                                    | 37        |
| 4.3.2 Teste de hemólise.....   | 38        |
| <b>4.4 TESTES <i>in vivo</i></b> .....                                     | <b>38</b> |
| 4.4.1 Animais.....   | 38        |
| 4.4.2 Manutenção da cepa de <i>Plasmodium berghei</i> .....                | 39        |
| 4.4.3 Teste da atividade antimalárica <i>in vivo</i> .....                 | 39        |
| 4.4.4 Contagem da parasitemia.....   | 39        |
| 4.4.5 Avaliação da atividade antimalárica.....                             | 40        |
| <b>4.5 ESTUDOS DE DOCKING MOLECULAR</b> .....                              | <b>40</b> |
| 4.5.1 Modelagem tridimensional da enzima pLDH.....                         | 40        |
| 4.5.2 Construção de caixas por simulação de docking molecular.....         | 41        |
| 2.5.3 Preparação dos ligantes.....   | 41        |

|   |    |
|---|----|
| 2.5.4 Docking .....   | 41 |
| 4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....                                       | 41 |
| <br>  |    |
| 5. RESULTADOS .....   | 42 |
| 5.1 ANÁLISE DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS <i>in silico</i> ..... | 42 |
| 5.2 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE <i>in vitro</i> .....                   | 44 |
| 5.2.1 Citotoxicidade em macrófagos .....                            | 44 |
| 5.2.2 Teste de hemólise .....                                       | 45 |
| 5.3 TESTES <i>in vivo</i> .....                                     | 46 |
| 5.3.1 Avaliação da atividade antimalárica .....                     | 46 |
| 5.3.2 Sobrevida .....   | 50 |
| 5.3 ESTUDOS DE DOCKING MOLECULAR .....                              | 51 |
| <br>  |    |
| 6. DISCUSSÃO .....  | 55 |
| <br>  |    |
| 7. CONCLUSÕES .....   | 62 |
| <br>  |    |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....                                    | 63 |

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 MALÁRIA

A malária é considerada, ainda nos dias de hoje, uma das três doenças infecciosas de maior mortalidade no mundo, juntamente com a síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) e a tuberculose (CHENG e YANSOUNI, 2013). A doença é causada por cinco espécies de parasitos do gênero *Plasmodium* que afetam os seres humanos: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* e *P. knowlesi*. A transmissão da malária ocorre naturalmente através do inseto vetor, que pica um indivíduo humano infectado e repassa a infecção ao picar um indivíduo sadio. Mais recentemente, casos de humanos infectados por *P. knowlesi*, uma espécie que infecta preferencialmente macacos, tem ocorrido na região do Sudeste Asiático. É sugerido que a infecção por *P. knowlesi* seja uma zoonose, pois sua transmissão ocorre apenas quando o mosquito pica um macaco infectado pelo parasito e repassa para um indivíduo humano através da picada (WHO, 2015a).

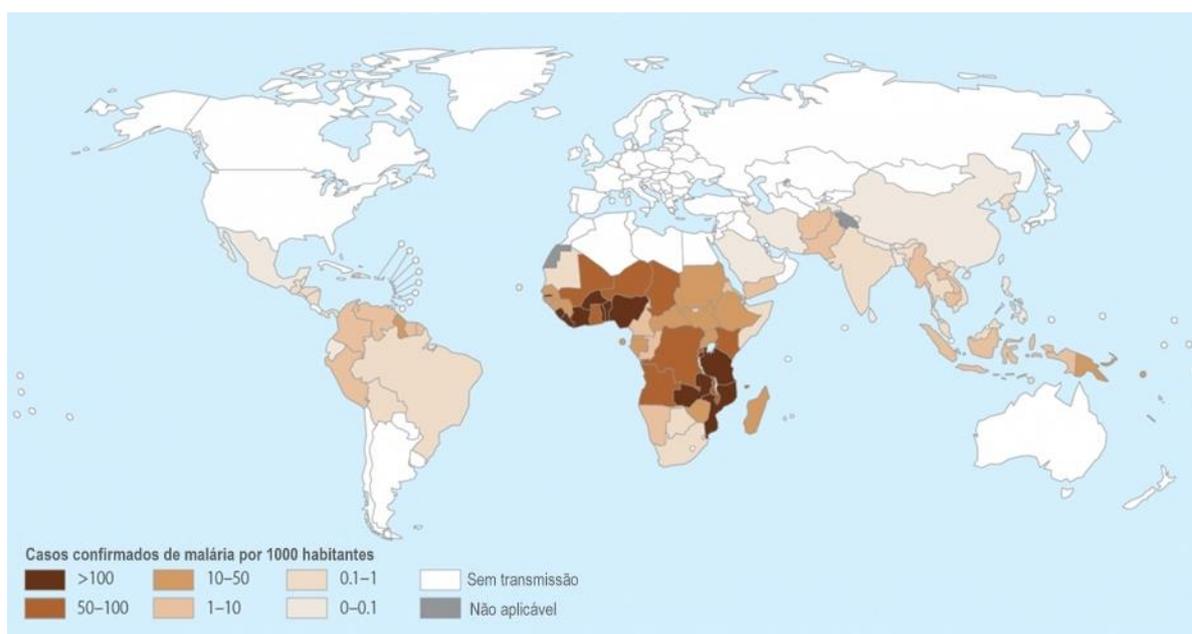
Os vetores da malária são mosquitos pertencentes à família Culicidae e ao gênero *Anopheles*, cujas fêmeas são transmissoras naturais, devido à sua característica hematófaga (BAI, GELMAN e PALLI, 2010). Existem cerca de 2500 espécies de mosquito identificadas. No entanto, apenas 50 a 60 dessas espécies pertencentes ao gênero *Anopheles* são capazes de transmitir a malária. *An. gambiae* é a espécie mais comum na África (BARIK, SAHU e SWAIN, 2009), enquanto *An. darlingi* é o principal vetor de malária no Brasil. Os mosquitos vivem em regiões tropicais e subtropicais, na América Central e do Sul em áreas de baixas altitudes, preferindo grandes corpos d'água onde tenha muito pouca ou nenhuma correnteza. Embora *An. darlingi* esteja presente em 80% do país, a incidência de malária no Brasil ocorre quase que exclusivamente na região amazônica (OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010).

### 1.1.1 Epidemiologia

Situação da Malária no Mundo

Estima-se que o número de casos de malária tenha sido de aproximadamente 212 milhões, em 2015, sendo a Região Africana a mais afetada, representando aproximadamente 90% dos casos de malária e 92% das mortes pela doença (**Figura 1**). Crianças menores de cinco anos de idade e mulheres grávidas são as pessoas mais gravemente afetadas (WHO, 2016).

Entre 2000 e 2015, a incidência estimada de malária reduziu 22% e a redução na taxa de mortalidade pela doença foi de 50%. Apesar dessa redução, o número de mortes por malária ainda é preocupante, chegando a cerca de 429.000 mortes em 2015 (WHO, 2016). Segundo o Roll Back Malaria, o continente Africano tem gastos anuais de 12 bilhões de dólares com doenças relacionadas à malária, mostrando que o aumento do investimento em medidas de prevenção, de diagnóstico e tratamento, novas intervenções, incluindo vacinas para prevenir a doença clínica e transmissão, são urgentemente necessários (BIRKETTA et al., 2013; WHO-ROLL BACK MALARIA, 2015).



**Figura 1** – Distribuição dos casos confirmados de malária no mundo. Fonte: WHO, 2014 (adaptado).

O número de casos de malária está fortemente associado à pobreza. As taxas de mortalidade são mais elevadas nos países com um valor mais baixo no produto nacional bruto *per capita*. Os países com maiores percentagens de pessoas vivendo abaixo do limiar da pobreza (menos de 2 dólares por pessoa por dia) tem taxas de mortalidade por malária mais elevadas. No interior dos países, as

populações mais pobres e as populações rurais apresentam as taxas mais elevadas de prevalência de infecção parasitária nas crianças (WHO, 2015b).

### Situação da Malária no Brasil

A malária permanece como sério problema de saúde pública no Brasil. Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) indicam que o país é responsável por 24% dos casos da doença notificados nas Américas (WHO, 2016). Segundo o Ministério da Saúde, no ano de 2014 foram registrados 143.552 casos de malária, sendo 4.625 casos importados de outros países (MS-SVS, 2015). Na região das Américas foram registradas 79 mortes devido à malária, sendo o Brasil responsável por quase metade dos óbitos (WHO, 2015a).

A Amazônia Legal, formada pelos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins e grande parte dos estados do Maranhão e Mato Grosso, é responsável pela grande maioria de notificações dos casos de malária no país (**Figura 2**). O maior número de casos é registrado nesta região devido às condições ambientais e socioculturais que favorecem a expansão e a transmissão da doença. Em 2014, o estado do Amazonas foi responsável por 47% dos casos, seguido pelo estado do Acre com 22% dos casos (BRASIL, 2009; MS-SVS, 2015).



**Figura 2** – Distribuição dos casos confirmados de malária (por 1000 habitantes) no Brasil. Fonte: WHO, 2015 (adaptado).

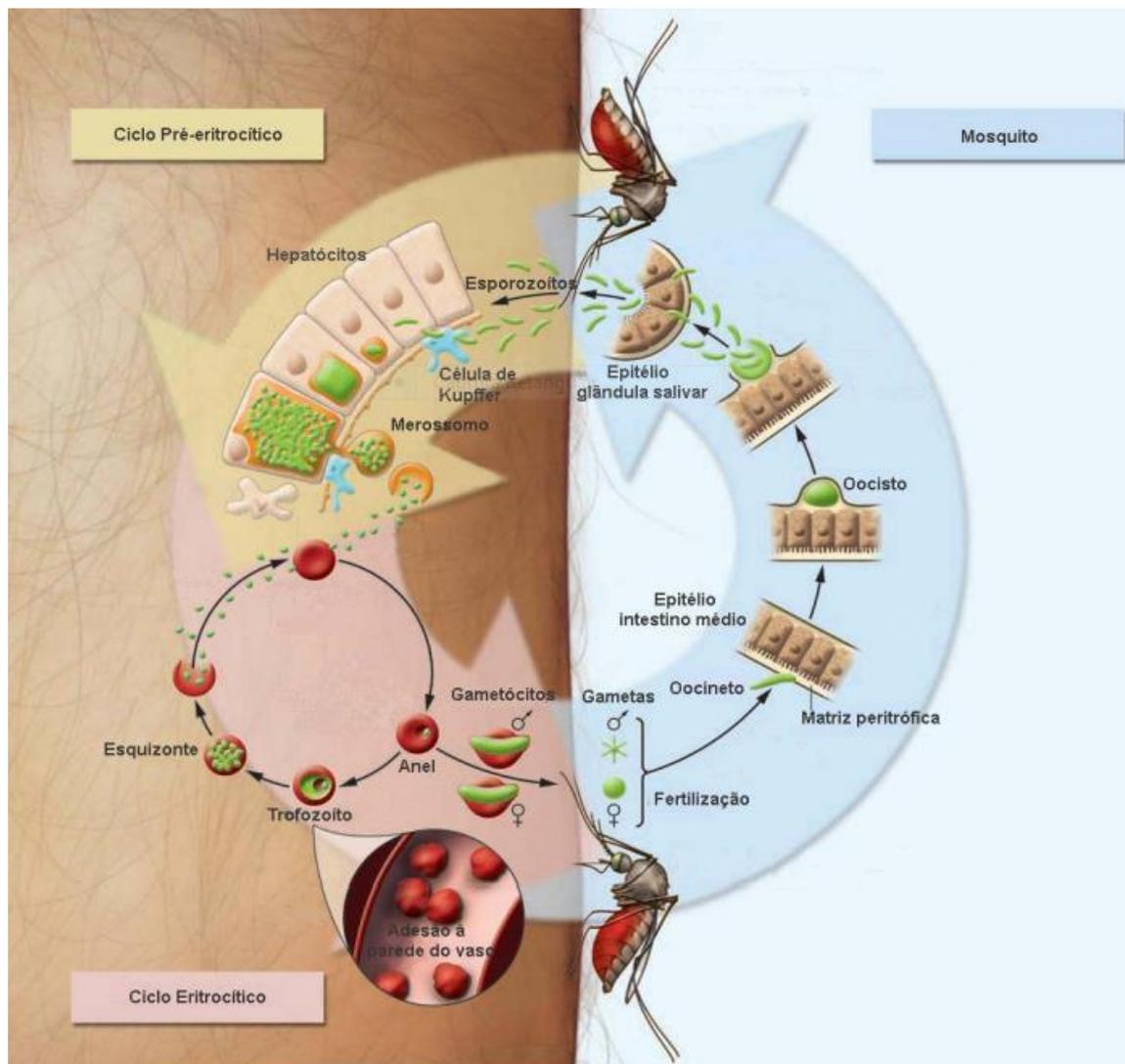
No Brasil as espécies de parasito que estão associadas a casos autóctones de malária em humanos são *P. vivax*, *P. malariae* e *P. falciparum*. *P. vivax* e *P. falciparum* são os principais causadores da doença, representando respectivamente 84% e 16% dos casos notificados no ano de 2014 (MS-SVS, 2015).

Visando a redução na incidência da malária no Brasil, o Ministério da Saúde criou em 2005 o Programa Nacional de Controle da Malária (PNCM). Seus objetivos englobam a redução da mortalidade, da malária grave e da incidência da doença. A vigilância epidemiológica da malária é um dos componentes do PNCM, cujos objetivos são o gerenciamento de dados epidemiológicos e consolidação das tarefas de rotina, como encaminhamento de resultados compilados para escritórios regionais e as suas sedes (GRIFFING et al., 2015).

Em novembro de 2015, o Ministério da Saúde criou o Plano de Eliminação da Malária, em parceria com a OMS. O documento define estratégias para o diagnóstico, tratamento, controle vetorial, educação em saúde e mobilização social. A medida faz parte dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) lançados pela Organização das Nações Unidas (ONU) em substituição aos Objetivos do Milênio. O objetivo do plano é a eliminação da malária no Brasil até 2030. No âmbito mundial, objetiva a redução de 90% nos casos de malária e eliminação da doença em 35 países até 2030 (BRASIL, 2015).

### 1.1.2 Transmissão e Patogenia

A malária é naturalmente transmitida para os seres humanos através da picada do mosquito fêmea do gênero *Anopheles* infectado com esporozoítos de *Plasmodium* (AMINO et al., 2006; WYKES e HORNE-DEBETS, 2012). Ao picar um indivíduo sadio, o mosquito infectado libera formas esporozoítas do parasito juntamente com diversos componentes solúveis como anti-histaminas, vasodilatadores, anticoagulantes, inibidores de agregação plaquetária e imunomoduladores, presentes nas glândulas salivares do *Anopheles* (**Figura 3**). Estas substâncias possuem papel importante para a sobrevivência do parasito no hospedeiro mamífero após a inoculação (AMINO et al., 2006; ZHENG, TAN e XU, 2014).



**Figura 3** - Ciclo biológico do *Plasmodium* no hospedeiro humano e no vetor *Anopheles*. Fonte: GREENWOOD et al., 2008 (adaptado – tradução livre).

Os esporozoítos são inoculados pelo mosquito, podendo atingir diretamente os vasos sanguíneos ou se depositar na pele do hospedeiro, permanecendo neste local por curto período. Parte dos esporozoítos permanece na região da picada, podendo se transformar em esporozoíto imóvel ou invadir e parasitar células do epitélio do hospedeiro (GUEIRARD et al., 2010). Outra parte é drenada pelo sistema linfático, podendo ser encontrada em forte associação com as células dendríticas no linfonodo proximal ao sítio de inoculação. Cerca de 30% dos esporozoítos atinge a corrente sanguínea e segue para o fígado do indivíduo infectado, dando início ao ciclo hepático (DERBYSHIRE et al., 2012; ZHENG, TAN e XU, 2014; MAC-DANIEL e MÉNARD, 2015).

No fígado, os esporozoítos invadem os hepatócitos, após atravessarem a camada sinusoidal, através das células de Kupffer e células epiteliais. A principal proteína de superfície do esporozoíto de *Plasmodium*, a proteína circunsporozoíta (CSP), parece ter um papel crucial nestes processos, interagindo com os proteoglicanos de sulfato de heparano (HSPGs) das células do fígado (PRUDÊNCIO, RODRIGUEZ e MOTA, 2006; ZHENG, TAN e XU, 2014). Por uma questão ainda desconhecida, o parasito migra através de diversos hepatócitos até que se instale em um hepatócito final, onde forma o vacúolo parasitóforo (PRADEL e FREVERT, 2001; MOTA et al., 2001; PRUDÊNCIO, RODRIGUEZ e MOTA, 2006). Estudos indicam que o processo de passagem dos parasitos por várias células, antes da invasão, parece ser fundamental para o ciclo de vida do parasito por induzir a exocitose de organelas apicais do esporozoíto, que estão envolvidas na formação de um vacúolo parasitóforo. A transmigração do parasito por vários hepatócitos os torna mais suscetíveis à infecção, favorecendo a invasão celular pelo esporozoíto (MOTA et al., 2002; ZHENG, TAN e XU, 2014).

Durante a invasão ao hepatócito definitivo, *Plasmodium* induz a formação do vacúolo parasitóforo, projetando-se para dentro da célula hospedeira por meio de uma invaginação da membrana celular. Inicialmente a membrana do vacúolo parasitóforo é formada pela membrana plasmática da célula hospedeira, que em seguida é substituída pela inserção de proteínas do parasito (RENNENBERG et al., 2010).

Após se instalar no vacúolo parasitóforo ocorre, a multiplicação e desenvolvimento do parasito, caracterizando a fase exoeritrocítica de seu ciclo evolutivo (PRUDÊNCIO, RODRIGUEZ e MOTA, 2006). Pelo processo de esquizogonia, os esporozoítos se replicam de forma assexuada e expandem a sua população originando os esquizontes e, posteriormente, milhares de merozoítos. Estes são liberados dos hepatócitos através dos merossomas, vesículas formadas pela membrana da célula hospedeira, contendo os merozoítos (DERBYSHIRE et al., 2012; WYKES e HORNE-DEBETS, 2012; ZHENG, TAN e XU, 2014). Em *P. vivax* e *P. ovale* alguns esporozoítos permanecem em estado de latência por longo tempo no fígado. Essas formas são chamadas hipnozoítos e se desenvolvem a esquizontes em um período de meses ou até anos após a infecção. Os hipnozoítos são responsáveis pelas recaídas em alguns pacientes tratados inadequadamente para malária (DEMBELE et al., 2011).

Os merozoítos hepáticos liberados na corrente sanguínea podem invadir eritrócitos, por meio de interações específicas entre receptores presentes na membrana do parasito e receptores específicos da superfície de hemácia (PRUDÊNCIO, RODRIGUEZ e MOTA, 2006). O processo de invasão celular se inicia com uma junção entre a membrana do eritrócito e qualquer parte da superfície do merozoíto. Em seguida o merozoíto reorienta-se, levando a uma ligação de alta afinidade entre a extremidade apical do parasito e a superfície do eritrócito. A proteína 1 de superfície dos merozoítos (MSP1) é mencionada como a principal molécula de reconhecimento às hemácias pelos merozoítos (PIZARRO et al., 2003). Após o primeiro contato entre as membranas, forma-se uma junção irreversível entre a membrana do parasito e do hospedeiro, por meio de receptores específicos. O parasito então move-se em direção ao interior do eritrócito num processo de invaginação da membrana da célula hospedeira, com a ajuda do motor miosina-actina. Ao mesmo tempo em que o parasito começa a invasão da célula, inicia também a formação do vacúolo parasitóforo, uma membrana que é derivada, em parte, da superfície do eritrócito (COWMAN, BERRY e BAUM, 2012; HARVEY, GILSON e CRABB, 2012).

Após a invasão aos eritrócitos, os merozoítos já se encontram na forma de trofozoítos jovens, também conhecida como forma de anel. Em seguida, na fase de trofozoítos maduros, o parasito intensifica a exportação de proteínas próprias para o citoplasma e membrana da célula hospedeira. Os trofozoítos maduros se desenvolvem em esquizontes, que se multiplicam por esquizogonia e formam novos merozoítos. Ao serem liberados na circulação sanguínea, os merozoítos poderão infectar outros eritrócitos, iniciando um novo ciclo eritrocítico (PRUDÊNCIO, RODRIGUEZ e MOTA, 2006). Para *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. ovale* o ciclo sanguíneo se reinicia a cada 48 horas, enquanto para *P. malariae* esse intervalo é de 72 horas. Para *P. knowlesi*, o intervalo de repetição do ciclo eritrocítico é de apenas 24 horas, o que propicia o desenvolvimento rápido de complicações (DANESHVAR, 2009; KANTELE e JOKIRANTA, 2011).

O ciclo de vida dos plasmódios continua quando alguns merozoítos evoluem para os estágios sexuais do parasito, os gametócitos masculinos e femininos, que podem ser adquiridos pelo mosquito durante o repasto sanguíneo. Dentro do intestino delgado dos anofelinos, os gametócitos sofrem rápida divisão celular, produzindo 8 microgametas flagelados. Cada um dos quais fertilizarão os

macrogametas formando assim o zigoto, que ao adquirir movimento se transforma em oocineto. O oocineto atravessa o epitélio do intestino, atingindo a lâmina basal onde, por encistamento, forma o oocisto. Em poucos dias, os oocistos sofrem a esporogonia e se rompem liberando centenas de esporozoítos que migrarão para as glândulas salivares do mosquito prontos para serem inoculados em outro hospedeiro vertebrado (FRANÇA, SANTOS e FIGUEROA-VILLAR, 2008; WYKES e HORNE-DEBETS, 2012).

As fases sanguíneas do ciclo dos plasmódios estão associadas com os sintomas e complicações da malária. No momento da ruptura do esquizonte, a liberação de materiais parasitários para a circulação induz processos fisiopatológicos da malária, dando início aos sintomas (GREENWOOD et al., 2008). A ativação da cascata de citocinas no organismo do hospedeiro é responsável por muitos dos sinais e sintomas de malária. Do ponto de vista clínico, a esquizogonia hepática é assintomática, já que apenas um pequeno número de células do fígado são infectadas (MILLER et al., 2002; BARTOLONI e ZAMMARCHI, 2012).

As características clínicas comuns às diferentes formas da malária incluem o ataque paroxístico, esplenomegalia, anemia e icterícia. O paroxismo da malária clássica apresenta três fases: uma fase fria, seguido por um estágio de febre e uma fase final de transpiração. O paroxismo típico começa com a fase de frio e tremores, podendo o indivíduo apresentar palidez e cianose, com duração de 1 a 2 horas. Durante as horas seguintes, o paciente apresenta picos de febre alta com pele quente e seca (GREENWOOD et al., 2008; BARTOLONI e ZAMMARCHI, 2012). O vômito é comum nesta fase e, por vezes, diarreia, cefaleia, garganta seca, sede excessiva e alterações da consciência também estão presentes. Em crianças pequenas pode ocorrer convulsão. Dentro de 2-6 horas, o paciente entra na terceira fase do paroxismo, a fase de sudação, com transpiração abundante e uma subsequente queda na temperatura corporal, tornando-a normalizada (GARCIA, 2010).

Em pacientes não tratados a malária pode se desenvolver na forma de sintomas graves em indivíduos mais suscetíveis, como crianças e gestantes, que podem ser fatais no caso de *P. falciparum*. A ocorrência de manifestações da malária grave são dependentes não apenas da idade do paciente, mas também de uma exposição prévia ao parasito. Esta síndrome é caracterizada como uma doença multissistêmica capaz de causar malária cerebral, anemia grave, insuficiência renal

aguda, edema pulmonar, colapso circulatório e acidose metabólica. (LACERDA-QUEIROZ, TEIXEIRA, TEIXEIRA, 2008; BRASIL, 2009).

## 1.2 O TRATAMENTO ANTIMALÁRICO

Os primeiros tratamentos disponíveis para malária eram principalmente baseados no uso de plantas e extratos. No século XVII, padres jesuítas vindos da Europa observaram que indígenas da América do Sul utilizavam cascas de uma árvore nativa, a *Cinchona* spp., para curar doenças febris (LÓPEZ et al., 2010; ACHAN et al., 2011). A casca da planta e sementes foram levadas para a Europa pelos jesuítas e usadas para tratar malária obtendo grande eficácia. Durante quase dois séculos, a casca da *Cinchona* foi utilizada em forma de pó, extrato ou infusão. Somente em 1820, o seu princípio ativo, o alcaloide quinina, foi isolado por Pierre Pelletier e Joseph Caventou (KOUZNETSOV e TORRES, 2008; CUNICO et al., 2008). Até o século passado, o quinina era o principal quimioterápico utilizado no combate à malária. Seu uso só foi reduzido em função da sua alta toxicidade e dificuldade de obtenção (BUTLER, KHAN e FERGUSON, 2010).

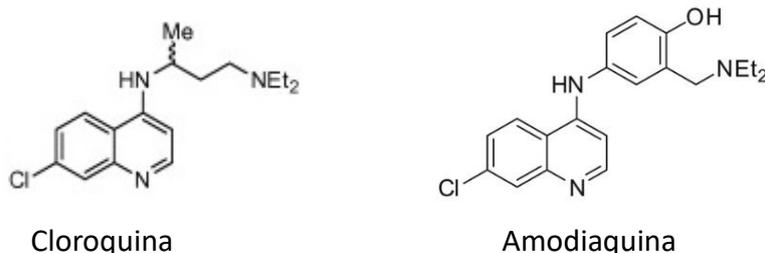
A busca por novos compostos para tratar a malária se intensificou durante a Segunda Guerra Mundial. A malária assolava grande parte dos militares norte-americanos em combate, reduzindo as chances de sucesso dos Estados Unidos na guerra. Neste contexto histórico, grandes investimentos foram feitos em estudos para a síntese de novos fármacos antimaláricos. A partir da molécula de quinina foi então sintetizada a cloroquina (CQ), que se tornou o principal substituto para o quinina, durante a Segunda Guerra Mundial (FRANÇA, SANTOS e FIGUEROA-VILLAR, 2008). A CQ foi considerada droga antimalárica ideal e usada por décadas devido a sua alta eficácia contra todas as espécies de parasitos da malária, sua baixa toxicidade, baixo custo e alta tolerância (DJIMDÉ et al., 2001; WELLEMS e PLOWE, 2001; KRETTLI et al., 2001).

Em 1955, com a criação do Programa de Erradicação da Malária pela OMS, a CQ passou a ser utilizada em larga escala para a eliminação da malária (NÁJERA, GONZÁLEZ-SILVA e ALONSO, 2011; SILVA e PAIVA, 2015). A administração de CQ em associação ao uso do inseticida DDT (diclorodifeniltricloroetano) - que tem o objetivo de eliminar o inseto vetor - mostrou grande eficácia, conseguindo eliminar gradualmente a malária nos países desenvolvidos. O

grande sucesso da CQ e seu intenso uso através das décadas levaram ao surgimento da resistência ao fármaco pelos plasmódios, principalmente *P. falciparum*, que causa a forma mais grave da malária (WELLEMS e PLOWE, 2001).

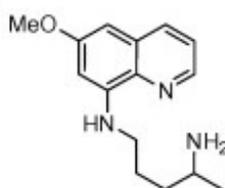
Pesquisas em busca de novos antimaláricos se intensificaram com a disseminação da resistência à CQ. O desenvolvimento dos novos compostos se baseava principalmente na modificação da estrutura da CQ, mantendo o anel quinolínic. Em 1947, foi desenvolvida a amodiaquina, com efetividade semelhante a CQ, mas com atividades também em cepas cloroquina-resistentes, sendo indicada para tratamento e profilaxia antimalárica (KOUZNETSOV e TORRES, 2008). Em 1990 a OMS retirou o composto do Programa de Erradicação da Malária e os fabricantes retiraram a indicação profilática da droga devido à severidade de seus efeitos adversos, como agranulocitose e hepatotoxicidade grave (VALE, MOREIRA e GOMES, 2005).

Cloroquina e amodiaquina são 4-aminoquinolinas (**Figura 4**), que atuam no estágio eritrocítico do parasito. Durante o estágio sanguíneo, o parasito metaboliza a hemoglobina por meio de proteases em globina e Ferriprotoporfirina IX (FP-IX), também chamada de heme. A porção globina é composta por aminoácidos, sendo utilizada pelos plasmódios para sua nutrição. A porção heme liberada, que contém o ferro, é tóxica para o parasito e para sua sobrevivência. As moléculas de heme são detoxificadas dentro do vacúolo digestivo do *Plasmodium* por biocristalização em grânulos insolúveis de hemozoína (GARAVITO, ARTEAGA e ACEBEY, 2002; KOUZNETSOV e GÓMEZ-BARRIO, 2009). As 4-aminoquinolinas inibem este processo de biocristalização do heme tóxico, deixando-o livre, o que leva a morte do parasito. O mecanismo pelo qual os compostos inibem a formação da hemozoína ainda não é bem elucidado. Acredita-se que as aminoquinolinas atuam principalmente ligando-se covalentemente ao heme, impedindo sua biocristalização. Porém, outros mecanismos ligados a degradação facilitada por peróxido de hidrogênio dentro do vacúolo digestivo, e uma degradação dependente de glutatona também já foram descritos (WELLEMS e PLOWE, 2001; KOUZNETSOV e GÓMEZ-BARRIO, 2009; BIAMONTE, WANNER, ROCH, 2013).



**Figura 4** - Fórmula estrutural das 4-aminoquinolinas. Fonte: BURROWS et al., 2014 (adaptado).

A primaquina (**Figura 5**) foi criada a partir da observação da atividade antimalárica do azul de metileno (KITCHEN, VAUGHN e SKILLMAN, 2006). Os estudos sobre esse composto se intensificaram durante a Segunda Guerra pelos Estados Unidos, em 1944, visto que era o único composto seguro para o tratamento de recaídas da malária, causada por hipnozoítos de *P. vivax* e *P. ovale* (BAIRD e HOFFMAN, 2004; WHITE, 2008). O uso da primaquina se intensificou na década de 1950, após a Guerra da Coréia, em que ocorreram vários casos de recidiva da malária, principalmente em soldados norte-americanos (KITCHEN, VAUGHN e SKILLMAN, 2006). Este composto é uma 8-aminoquinolina que possui ação contra gametócitos e contra formas latentes do fígado, tendo pouca ou nenhuma ação conhecida sobre a forma eritrocítica do parasito (BRUNTON, LAZO e PARKER, 2006; UDOMSANGPETCH et al., 2008). O mecanismo de ação antimalárica dessa classe é pouco conhecido; suspeita-se que a primaquina pode ser convertida em eletrólitos que irão mediar reações de óxido-redução, produzindo espécies reativas de oxigênio ou afetando o transporte de elétrons do parasito, exercendo dessa forma sua atividade antimalárica (BAIRD e HOFFMAN, 2004; FERREIRA, GOMES e VIEIRA, 2011).

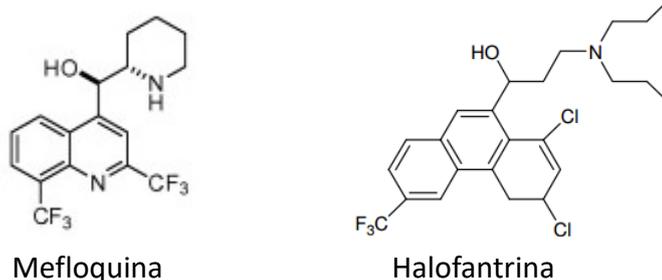


Primaquina

**Figura 5** - Fórmula estrutural da primaquina. Fonte: BURROWS et al., 2014 (adaptado).

Mefloquina e halofantrina (**Figura 6**) são aril-aminoálcoois, que surgiram em um dos maiores programas de incentivo à descoberta de novos fármacos

antimaláricos, do *Walter Reed Army Institute of Research* (WRAIR), nos Estados Unidos da América, que funcionou de 1963 até 1976. Os compostos foram desenvolvidos a partir de análogos da quinina após a Guerra do Vietnã, onde cerca de 1% das tropas americanas contraíu malária (SHANKS, 1994; KITCHEN, VAUGHN e SKILLMAN, 2006). O uso terapêutico da mefloquina começou no final da década de 1980, visando o tratamento de infecções por cepas de *Plasmodium* multi-resistente e profilaxia da malária (CROFT, 2007). Devido aos efeitos neurotóxicos descritos, a utilização do medicamento para profilaxia só é feito após se avaliar a necessidade e os riscos ao paciente (TOOVEY, 2009). A halofantrina teve seu uso aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) em 1992 (KITCHEN, VAUGHN e SKILLMAN, 2006). Foi considerada um medicamento seguro para o tratamento de malária causada por cepas *Plasmodium* resistentes à CQ até 1993, quando foram demonstrados os primeiros casos de cardiotoxicidade pelo seu uso (BOUCHAUD et al., 2009).



**Figura 6** - Fórmula estrutural dos aril-aminoálcoois. Fonte: BURROWS et al., 2014 (adaptado).

Acredita-se que o mecanismo de ação dos aril-aminoálcoois seja semelhante ao das 4-aminoquinolinas, inibindo a biocristalização do grupo heme em hemozoína, por ligação ao grupo heme (SILVA et al., 2005; VALE, MOREIRA e GOMES, 2005; PINHEIRO et al., 2013). Alguns estudos mostram que os aril-aminoálcoois também podem interferir na integridade dos fosfolípidos de membrana do vacúolo digestivo por peroxidação lipídica, levando à morte do parasito (GO e LI, 2003).

A atividade antimalárica da classe de antagonista de folato, que bloqueiam a síntese de ácido nucleico necessária para a multiplicação do parasito, foi reconhecida na década de 1940 (KITCHEN, VAUGHN e SKILLMAN, 2006). A pirimetamina (**Figura 7**), sintetizada em 1950 nos Estados Unidos, era inicialmente





ACT) (ADITYA et al, 2013; BIAMONTE, WANNER e ROCH, 2013; CHENG e YANSOUNI, 2013).

O isolamento da artemisinina pode ser considerado uma das maiores descobertas do século XX. No ano de 2015, a pesquisadora chinesa Youyou Tu recebeu o prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia pela descoberta e isolamento da artemisinina (NOBEL PRIZE, 2015). Durante as últimas décadas, estes tratamentos altamente eficazes, juntamente com outras medidas de controle da malária, têm contribuído para uma redução significativa da carga da doença em muitas áreas do mundo, incluindo partes da África (DONDORP et al., 2011; TU, 2011).

### 1.2.1 Resistência aos antimaláricos

A resistência a um fármaco é definida como a capacidade de um parasito sobreviver e se multiplicar na presença de concentrações desse fármaco que normalmente o destruiriam ou preveniriam a sua multiplicação (WHO, 1967). A resistência à quimioterapia é um dos maiores problemas no controle da epidemia de malária. A habilidade de adaptação de *P. falciparum* é evidenciada pela rapidez no desenvolvimento de resistência a grande parte dos antimaláricos utilizados para o tratamento da doença. Atualmente, cepas com esta característica estão espalhadas por todas as áreas endêmicas do mundo (SILVA e OLIVEIRA, 2002; FRANÇA, SANTOS e FIGUEROA-VILLAR, 2008).

A resistência de *P. falciparum* à CQ foi documentada inicialmente em partes do sudeste da Ásia e da América do Sul no fim dos anos 1950, e foi generalizada em quase todas as áreas com malária por *P. falciparum*, na década de 1980 (RIDLEY, 2002; FAROOQ e MAHAJAN, 2004). No Brasil, o primeiro caso de ineficácia do uso de CQ no tratamento contra malária por *P. falciparum* foi registrado em 1954 e desde então se espalhou pela região Amazônica (COUTO et al., 1995). As moléculas envolvidas na resistência à CQ identificadas são o transportador de resistência à cloroquina (*Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter – PfCRT) e o transportador de resistência a multidrogas tipo 1 (*Plasmodium falciparum* multi-drug resistance 1 - PfMDR1). Ambas as proteínas transportadoras são expressas na membrana do vacúolo digestivo e estão envolvidas no transporte de drogas por essa membrana (COWMAN et al., 1991; BRAY et al., 1998).

Em 1989 foi registrado o primeiro caso de resistência de *P. vivax* à CQ, em Papua Nova Guiné (RIECKMANN, DAVIS e HUTTON, 1989). Cepas de *P. vivax* CQ-resistente já foram relatadas no Sudeste da Ásia e América do Sul (BAIRD, 2004), inclusive no Brasil (ALECRIM, ALECRIM e MACÊDO, 1999). O surgimento de resistência em *P. vivax* parece estar relacionado à mutação no gene *pvmdr1* que codifica transportador análogo à PfMDR1 (SUWANARUSK et al., 2007).

A resistência aos antifolatos, que passaram a ser utilizados em substituição a CQ no tratamento de malária resistente, surgiu no final dos anos 1970, limitando o seu uso (FERRARONI e HAYES, 1979). A resistência a estes compostos está principalmente relacionada a mutações em genes que codificam as enzimas alvo em *P. falciparum* (FOOTE, GALATIS E COWMAN, 1990; WANG et al., 1995). Com o surgimento de novos compostos antimaláricos, surgiram também novos mecanismos de resistência dos parasitos a estes fármacos.

Falhas no tratamento com ACT foram relatadas inicialmente em 2008, na fronteira entre Tailândia e Camboja, sugerindo o possível surgimento de cepas resistentes a este tratamento (NOEDL et al., 2008). A diminuição da susceptibilidade do *P. falciparum* ao tratamento com ACT já é encontrada em grande parte do Sudeste Asiático, o que agrava preocupações acerca da eficácia no tratamento antimalárico preconizado (TUN et al., 2016).

### **1.3 BUSCA POR NOVOS ANTIMALÁRICOS**

O problema de saúde global que a malária representa, ainda nos dias atuais, está principalmente relacionado à falta de uma vacina eficaz para prevenir a doença e ao desenvolvimento de resistência pelo *Plasmodium* aos antimaláricos disponíveis. Portanto, a necessidade de se obter novos antimaláricos, preferencialmente com novos mecanismos de ação é urgente e eminente (RIDLEY, 2002; FRANÇA, SANTOS e FIGUEROA-VILLAR, 2008; VAROTTI et al., 2008).

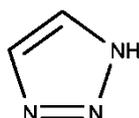
Uma estratégia interessante para descoberta de novas drogas é através da pesquisa da existência de atividade antimalárica em classes de drogas utilizadas no tratamento de outras doenças (NZILA et al., 2010). Um bom exemplo é a já citada pirimetamina, que foi inicialmente sintetizada para ser usada como anticancerígeno e posteriormente teve sua atividade antiplasmodial descoberta (KITCHEN, VAUGHN e SKILLMAN, 2006; ZHENG et al., 2013). O processo de busca por novos fármacos

torna-se ainda mais interessante se os compostos forem de síntese fácil e barata, visto que a doença acomete, na maioria dos casos, populações de baixa renda (KEITH et al., 2005; VALE, MOREIRA e GOMES, 2005; CASAGRANDE et al., 2008). Neste contexto os triazóis têm ocupado um papel importante na química medicinal por serem de fácil obtenção, apresentarem-se estáveis à degradação metabólica e possuírem um elevado momento de dipolo, sendo capazes de realizar ligação ao hidrogênio, podendo atuar favorecendo a ligação de moléculas em alvos biomoleculares (CORRALES et al., 2011; DUAN et al., 2013; HAMANN et al., 2014). Triazóis são compostos que associados a outras moléculas apresentam diversas atividades biológicas comprovadas, como antifúngicos (AHER et al., 2009), antibacterianos (DEMARAY et al., 2008; WANG, WAN e ZHOU, 2010), antirretrovirais (WHITING et al., 2006; GIFFIN et al., 2008), antituberculosos (COSTA et al., 2006; PATPI et al., 2012), anti-inflamatórios (SIMONE et al., 2011) e atividade antineoplásica (DUAN et al., 2013).

Estudos já realizados por Corrales et al., 2011 e Soares et al., 2013 demonstram atividade antimalárica e leishmanicida de compostos associados a 1,2,3-triazol. Os promissores resultados obtidos nesses trabalhos levaram a síntese de novas moléculas contendo triazóis que foram testadas no presente estudo para a avaliação de sua potencial atividade antimalárica.

### 1.3.1 Triazóis

Os triazóis são anéis heterocíclicos de cinco membros, substituídos com três átomos de nitrogênio. 1,2,3-triazol (**Figura 9**) é uma estrutura presente em uma diversidade de fármacos e, muitas vezes, corresponde à parte da molécula responsável pela sua atividade biológica, sendo o grupo farmacofórico (WHITING et al., 2006).



**Figura 9** - Estrutura de 1,2,3-triazol. Fonte: Própria autora.

A atividade antimalárica de derivados de 1,2,3-triazóis já foi demonstrada por diversos autores (BAKUNOV et al., 2010; SINGH et al., 2011; HAMANN et al.,

2014; BOECHAT et al., 2014). Acredita-se que os triazóis possam atuar de diferentes formas (PATIL et al., 2010; MCCONVILLE et al., 2015; SANTOS et al., 2016). Um alvo de ação extensamente estudado para 1,2,3-triazol em *Plasmodium* é a enzima lactato desidrogenase plasmodial (pLDH) (CAMERON et al., 2004; GRANCHI et al., 2010; PENNA-COUTINHO et al., 2011). Devido a sua semelhança estrutural com NADH, acredita-se que 1,2,3- triazol se liga no sítio de ação da enzima, impedindo a ligação do seu cofator. A enzima LDH atua na fase final do processo glicolítico, convertendo piruvato em lactato, responsável pela geração de energia para o parasito. A ligação de 1,2,3-triazol no sítio de ação leva a inibição da enzima, podendo levar a morte do parasito (WINTER et al., 2003; GRANCHI et al., 2010; PENNA-COUTINHO et al., 2011).

Além disso, a pLDH pode ser considerada um interessante alvo de ação, pois possui grande diferença estrutural com a enzima em humanos, demonstrando especificidade de possíveis compostos que possam atuar na LDH de *Plasmodium* (READ et al., 2001; OLIVEIRA e FRANÇA, 2011).

## 2. JUSTIFICATIVA

Apesar da redução de cerca de 50% no número óbitos por malária nos últimos 15 anos, o número de mortes pela doença ainda mostra grande impacto na saúde pública mundial, se aproximando de meio milhão de óbitos anuais (WHO, 2016).

A falta de uma vacina efetiva para malária, a dificuldade de controle do vetor da doença e o surgimento de resistência por parte dos plasmódios aos antimaláricos disponíveis, inclusive o mais recente surgimento de resistência ao ACT (NOEDL, 2008), geram grande preocupação acerca do futuro do tratamento contra a malária.

Antimaláricos eficazes, apropriados e seguros, ainda são necessários para solucionar os problemas decorrentes do desenvolvimento da multirresistência dos parasitos aos medicamentos em uso (RIDLEY, 2002). Portanto a busca de compostos ativos contra o parasito é uma estratégia promissora no desenvolvimento de novos fármacos, sendo o objetivo central do presente estudo.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a citotoxicidade e atividade antimalárica de compostos derivados de 1,2,3-triazóis, usando modelo murino de infecção.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a físico-química dos compostos testados de acordo com os parâmetros estipulados na regra dos cinco de Lipinski.
- Avaliar o potencial citotóxico *in vitro* dos compostos derivados de 1,2,3-triazóis utilizando macrófagos peritoneais murinos.
- Avaliar o potencial citotóxico *in vitro* dos compostos derivados de 1,2,3-triazóis por teste de hemólise utilizando eritrócitos humanos.
- Avaliar a atividade antimalárica de compostos derivados de 1,2,3-triazóis através de testes *in vivo* utilizando camundongos infectados com *P. berghei* e a atuação destes compostos no prolongamento da sobrevivência dos camundongos.
- Avaliar o possível alvo de ação dos compostos através de estudos de docking molecular.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 COMPOSTOS QUÍMICOS ANALISADOS

Os compostos derivados de 1,2,3-triazóis 1,4-dissubstituídos e sais derivados de 1,2,3-triazóis 1,3,4-trissubstituídos foram cedidos pelo Prof. Dr. Adilson David da Silva do Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Juiz de Fora. As nomenclaturas, estruturas químicas e código atribuído a cada um deles se encontram relacionados na **Tabela 1**.

#### 4.1.1 Solubilização dos compostos para testes *in vivo*

Para realização dos ensaios *in vivo*, os compostos foram solubilizados de acordo com suas propriedades químicas. Os compostos-teste foram diluídos em água + DMSO (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) a 5% e a CQ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) em água. A concentração utilizada para o teste foi de 10 mg/Kg, sendo a mesma concentração utilizada para a CQ. Todas as soluções foram preparadas no dia da realização do experimento.

#### 4.1.2 Solubilização dos compostos para testes *in vitro*

Os compostos foram diluídos em DMSO (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) estéril para a obtenção de soluções a 0,3 M, em seguida foi realizada diluição em água estéril, obtendo soluções de 3 mM. Estas soluções foram diluídas em placas de 96 poços, por diluição seriada obtendo concentrações de 150  $\mu$ M a 0,07  $\mu$ M.

Tabela 1 – Estrutura e classificação química dos compostos derivados de 1,2,3-triazol.

| Código       | Estrutura | Classificação química                               |
|--------------|-----------|---|
| Composto (1) |           | Derivado de 1,2,3-triazol 1,4-dissubstituído        |
| Composto (2) |           | Derivado de 1,2,3-triazol 1,4-dissubstituído        |
| Composto (3) |           | Sal derivado de 1,2,3-triazol 1,3,4-trissubstituído |
| Composto (4) |           | Sal derivado de 1,2,3-triazol 1,3,4-trissubstituído |
| Composto (5) |           | Sal derivado de 1,2,3-triazol 1,3,4-trissubstituído |
| Composto (6) |           | Sal derivado de 1,2,3-triazol 1,3,4-trissubstituído |
| Composto (7) |           | Sal derivado de 1,2,3-triazol 1,3,4-trissubstituído |
| Composto (8) |           | Sal derivado de 1,2,3-triazol 1,3,4-trissubstituído |
| Composto (9) |           | Sal derivado de 1,2,3-triazol 1,3,4-trissubstituído |

## 4.2 ANÁLISE DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS *in silico*

Foram analisadas as propriedades físico-químicas relativas à absorção e permeabilidade estimadas a partir da aplicação da regra de Lipinski baseada em quatro parâmetros. Foi utilizado o software *Molsoft L. L. C.* disponível no site [www.molsoft.com](http://www.molsoft.com) para a realização dos cálculos.

A regra de Lipinski, também conhecida como regra dos cinco (*Rule of Five*), foi desenvolvida por Lipinski e colaboradores em 1997. A regra tem como objetivo estimar a solubilidade e permeabilidade de fármacos administrados por via oral, predizendo a influência da estrutura química na absorção de um composto. Segundo Lipinski, os critérios a serem analisados são: a massa molecular, que deve ser menor ou igual a 500; o log P, cujo valor não deve ultrapassar 5; grupos doadores de ligação de hidrogênio, devendo ser menor ou igual a 5 (expresso pela soma de OH e NH na molécula) e grupos de aceptores de ligação de hidrogênio, menor ou igual a 10 (expresso pela soma de átomos de N e O). Compostos que obedecem a três desses quesitos seguem a regra de Lipinski. (LIPINSKI et al., 2001).

### **4.3 TESTES DE TOXICIDADE *in vitro***

#### **4.3.1 Citotoxicidade em macrófagos**

Para verificar a citotoxicidade *in vitro* foram utilizados macrófagos peritoneais de camundongos Suíços estimulados com 2 mL de tioglicolato (Himedia, Mumbai, Índia) a 4%, 72h antes da realização do teste. A extração dos macrófagos foi feita realizando-se lavado peritoneal com a manutenção das células em solução de PBS e em gelo. Após centrifugação, as células foram ressuspensas em meio RPMI-1640 (Cultilab, Campinas, SP, BR) suplementado com soro bovino fetal (SBF) (Cultilab, Campinas, SP, BR) 10% e  $10^6$  células foram adicionadas em cada poço, em uma placa de cultivo de 96 poços. Após a adição dos compostos nas diferentes concentrações em volume de 10  $\mu$ L por poço, as células foram mantidas em estufa a 37° C, 5% de CO<sub>2</sub>. Após 72 horas de incubação, a viabilidade dos macrófagos foi determinada pelo método colorimétrico do 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5 difenil tetrazólico (MTT; Sigma, Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA), adicionando-se 10 $\mu$ L de MTT (5mg/mL) por poço. Decorridas 2 horas, a reação foi interrompida com álcool isopropílico acidificado com HCl 0,4% a um volume de 100  $\mu$ L por poço. A absorbância foi medida a 570 nm em espectrofotômetro (SPECTRAMAX 190, Molecular Devices) (MOSSMANN, 1983). Os compostos foram testados em duplicata, e foram realizados três experimentos independentes para cada composto. A citotoxicidade foi expressa pela razão: leitura obtida nos poços com células

expostas aos compostos / leitura dos poços controle que não foram incubados com compostos x 100. A concentração dos compostos que promoveu a morte de 50% das células da cultura celular (CC<sub>50</sub>) foi calculada utilizando o software GraFit versão 7.0.2.

#### 4.3.2 Teste de hemólise

Outro parâmetro para avaliar a toxicidade dos compostos utilizou a análise do potencial hemolítico dos compostos. O teste de hemólise foi realizado com descrito por Wang et al. (2010). Eritrócitos humanos foram diluídos em PBS obtendo uma suspensão a 1%. A suspensão de eritrócitos foi distribuída em microtubos previamente identificados, a um volume de 180 µL. Os compostos foram adicionados nos microtubos nas concentrações obtidas pela diluição seriada a um volume de 20 µL obtendo, para cada composto, concentrações finais de 0,07 a 150 µM. Uma solução de saponina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) a 1% foi utilizada como controle positivo do teste, pela capacidade de gerar 100% de hemólise. A suspensão de hemácias a 1% foi utilizada como controle negativo, por não gerar hemólise. Os microtubos foram então encubados por 12 horas a 37°C. Posteriormente foram centrifugados a 2000 rpm por 5 minutos (Thermo Scientific Haraeus Megafuge 16R) e seus sobrenadantes transferidos para uma microplaca de fundo chato. Cada concentração dos compostos foi avaliada em duplicata e foram realizados três experimentos independentes para cada composto. A leitura foi realizada a 540nm em espectrofotômetro (SPECTRAMAX 190, Molecular Devices). A taxa de hemólise das amostras foi calculada como:

$$\% \text{ Hemólise} = \left( \frac{\text{Leitura média dos compostos} - \text{leitura média do controle negativo}}{\text{Leitura média do controle positivo}} \right) \times 100$$

### 4.4 TESTES *in vivo*

#### 4.4.1 Animais

Foram utilizados camundongos suíços *outbred* fêmeas, pesando entre 26g ± 2 g obtidos do Centro de Biologia da Reprodução (CBR) da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), sob processo aprovado no Comitê de Ética no Uso

de Animais número 041/2014-CEUA e 042/2014-CEUA. Os animais receberam água e ração própria para roedores *ad libidum*.

#### 4.4.2 Manutenção da cepa de *Plasmodium berghei*

Foi utilizada a linhagem de *P. berghei* NK 65, mantida semanalmente através da passagem de camundongos infectados para camundongos sadios. O procedimento foi realizado através da retirada de sangue por veia caudal de um camundongo previamente infectado. Gotas desse sangue foram diluídas em 2 mL de tampão fosfato salino (Phosphate Buffered Saline – PBS) e 0,2 ml do preparado foi inoculado por via intraperitoneal (i.p.) em um camundongo sadio. Quando era atingida uma parasitemia ideal, o sangue do camundongo já estava apto para ser utilizado nos experimentos.

#### 4.4.3 Teste da atividade antimalárica *in vivo*

Os compostos foram testados *in vivo* em camundongos infectados com as formas sanguíneas do parasito *P. berghei*. O procedimento foi realizado baseado no teste supressivo de Peters (PETERS, 1965), com algumas modificações. Camundongos foram inoculados com  $1 \times 10^6$  eritrócitos infectados por via i.p. Os animais foram divididos ao acaso em grupos de cinco e os grupos-teste receberam a droga, por via oral, durante quatro dias consecutivos a partir do dia da infecção. Um grupo foi separado para controle negativo, tratado somente com água + 5% de DMSO, e outro para controle positivo, tratado com CQ na mesma dose dos compostos teste (10mg/Kg).

#### 4.4.4 Contagem da parasitemia

A parasitemia foi avaliada nos 5°, 7°, 9° e 12° dias após a infecção através da contagem dos parasitos em esfregaços sanguíneos, fixados por metanol e corados com Giemsa, observados em microscópio óptico, utilizando objetiva de imersão a 1.000 X. A parasitemia foi determinada pela porcentagem de hemácias infectadas usando como universo a quantidade de hemácias totais que variou de

acordo com uma estimativa inicial de parasitemia: <5%: 4 mil hemácias; 5-10%: 3 mil; 10-15%: 2 mil; 15-20%: 1.500; >20%: 1mil.

A solução de coloração foi obtida pela adição de 5 gotas de Giemsa puro em 1 mL de água tamponada. Após trinta minutos as lâminas foram colocadas para secar e posteriormente examinadas ao microscópio.

#### 4.4.5 Avaliação da atividade antimalárica

A atividade da substância-teste foi avaliada através da média das parasitemias por grupo. A inibição da multiplicação do parasito (IMP) no grupo tratado em comparação com o grupo de controle negativo foi calculada pela expressão:

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

na qual A é a média da parasitemia no grupo de controle negativo e B é a média da parasitemia no grupo teste. O resultado é expresso em porcentagem de inibição da multiplicação do parasito (CARVALHO et al., 1991; ANDRADE-NETO et al., 2003).

### 4.5 ESTUDOS DE DOCKING MOLECULAR

Os estudos de docking molecular foram realizados em parceria com a prof<sup>a</sup> Dra. Priscila V. Z. Capriles Goliatt, do Departamento de Ciência da Computação, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Juiz de Fora.

#### 4.5.1 Modelagem tridimensional da enzima pLDH

O *template* 1OC4 para a construção tridimensional da enzima LDH de *P. berghei* foi obtido através do *Protein Data Bank* (PDB). A estrutura 3D de homotetrâmero da enzima foi gerada através de um *script* do programa PyMOL versão 1.4.1. A estrutura da enzima utilizada neste trabalho foi preparada utilizando o pacote 9.3.5 do Schrodinger Maestro, com o PrepWizard versão 4.0.518.

#### 4.5.2 Construção de caixas por simulação de docking molecular

A *grid* foi construída usando o programa GLIDE versão 5.8.518. O tamanho da *grid* para a enzima foi 36Å (22 Å externo, 14Å interno) e centrada entre a histidina 182 e um dos anéis de NAD, localizado no sítio ativo. As coordenadas da *grid* para pLDH são X = 23,89, Y = 20,69 e Z = 38,95.

#### 2.5.3 Preparação dos ligantes

Os compostos ligantes foram preparados utilizando o pacote 9.3.5 do Schrodinger Maestro, com o programa Ligprep versão 4.0.518.

#### 2.5.4 Docking

O docking molecular entre os compostos e a pLDH predita foi feito usando o pacote 9.3.5 da Schrodinger Maestro e a ferramenta AutoDock Vina versão 1.1.2. O programa PyMOL versão 1.4.1 foi usado para visualização das imagens com alta resolução.

### 4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise estatística dos dados foi utilizado o software GraphPad Prism 5 (GraphPad Inc, EUA). Para caracterizar a distribuição dos dados, foi utilizado o teste de Kolmogorov-Smirnov. Para análise dos testes *in vivo*, foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney para comparação entre duas amostras independentes. Resultados de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente diferentes.

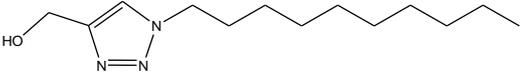
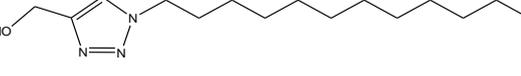
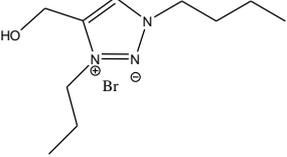
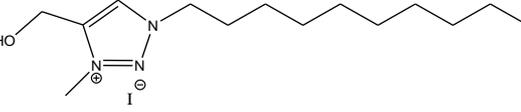
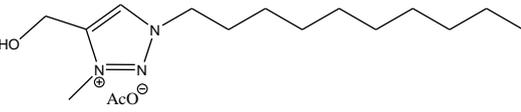
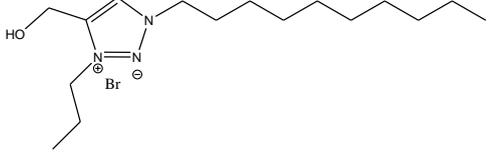
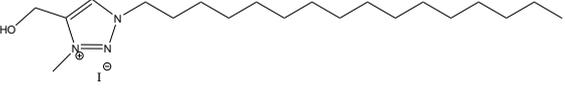
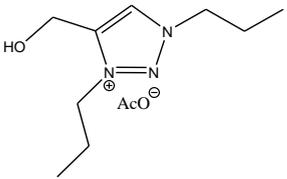
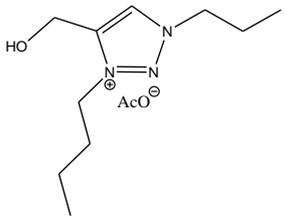
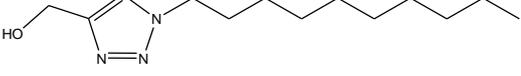
## 5. RESULTADOS

### 5.1 ANÁLISE DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS *in silico*

A avaliação dos compostos de acordo com a regra dos cinco de Lipinski colabora com a análise das propriedades físico-químicas dos compostos, mostrando se estes podem representar uma possível boa droga. A regra dos cinco de Lipinski calcula, a partir da estrutura química dos compostos, parâmetros que indicam se os compostos apresentam boa absorção oral. Os parâmetros avaliados são coeficiente de partição calculado octanol / água (Log P) que deve ser <5, massa molecular (M.M.) <500, número de átomos aceptores de ligação de hidrogênio (HAB) <10 e número de átomos doadores de ligação de hidrogênio (HDB) <5. Compostos que apresentam menos de 2 violações a esses quesitos seguem a regra de Lipinski.

A **Tabela 2** mostra que todos os compostos avaliados seguiram a regra dos cinco, indicando serem interessantes para avaliação de suas atividades *in vivo*.

Tabela 2 - Previsão teórica da solubilidade e permeabilidade de derivados de 1,2,3-triazóis.

|     | Composto  | Log P (<5) | M.M. (<500) | HAB (<10) | HDB (<5) | Nº de violações (<2) |
|-----|---|------------|-------------|-----------|----------|----------------------|
| (1) |    | 3,34       | 239,357     | 3         | 1        | 0                    |
| (2) |    | 4,30       | 267,410     | 3         | 1        | 0                    |
| (3) |    | 2,39       | 278,189     | 2         | 1        | 0                    |
| (4) |    | 4,37       | 381,297     | 2         | 1        | 0                    |
| (5) |   | 3,27       | 313,436     | 4         | 1        | 0                    |
| (6) |  | 5,28       | 362,349     | 2         | 1        | 1                    |
| (7) |  | 7,26       | 465,455     | 2         | 1        | 1                    |
| (8) |  | 0,85       | 243,303     | 4         | 1        | 0                    |
| (9) |  | 1,33       | 257,329     | 4         | 1        | 0                    |
| CQ  |  | 4,54       | 319,88      | 4         | 1        | 0                    |

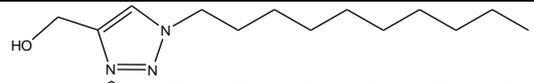
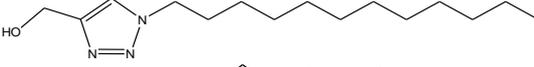
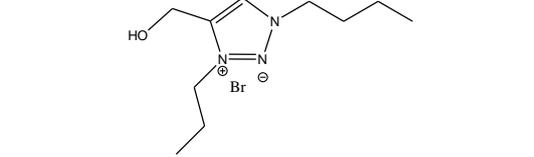
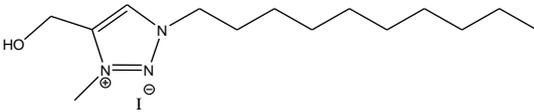
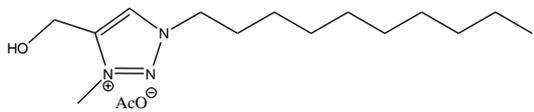
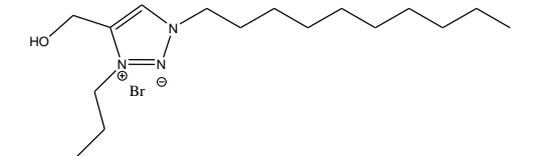
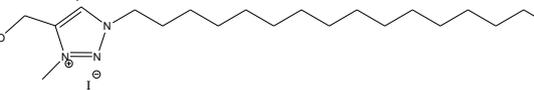
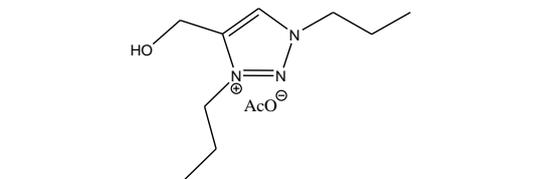
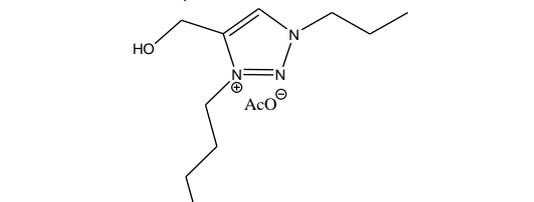
\* Todos os cálculos foram realizados através do programa Molsoft L. L. C.

## 5.2 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE *in vitro*

### 5.2.1 Citotoxicidade em macrófagos

Os sais testados neste estudo apresentaram certo grau de toxicidade, como mostra a **Tabela 3**, principalmente os compostos (3), (4), (6) e (7). Estes compostos apresentam haleto (Br ou I) na estrutura de suas moléculas, diferente dos compostos que apresentaram valores menores de  $CC_{50}$ , que possuem em sua estrutura um grupo acetóxi (AcO).

**Tabela 3** - Atividade citotóxica de derivados de 1,2,3-triazóis utilizando macrófagos peritoneais murinos, avaliada no ensaio de MTT.

| Composto  | $CC_{50}$ ( $\mu$ M) (média $\pm$ DP) |
|---|---------------------------------------|
| (1)    | 54,07 $\pm$ 0,33                      |
| (2)   | >150,00                               |
| (3)  | 10,69 $\pm$ 1,57                      |
| (4)  | 0,454 $\pm$ 0,17                      |
| (5)  | 105,66 $\pm$ 5,58                     |
| (6)  | 0,138 $\pm$ 0,04                      |
| (7)  | 5,29 $\pm$ 1,60                       |
| (8)  | >150,00                               |
| (9)  | 103,92 $\pm$ 7,36                     |

CQ

&gt;150,00

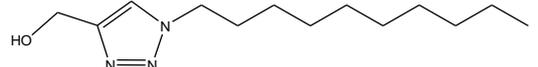
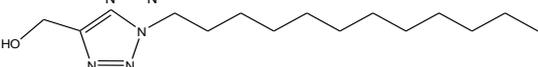
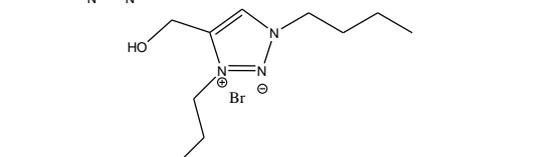
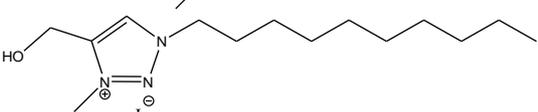
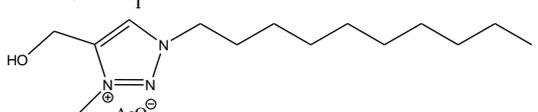
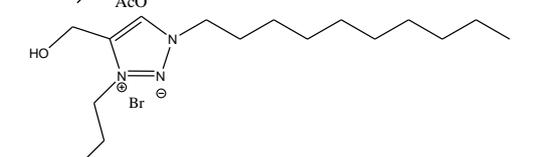
DP: desvio padrão

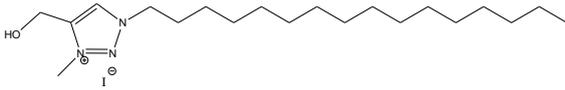
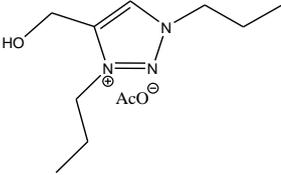
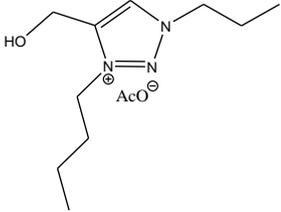
### 5.2.2 Teste de hemólise

Salt triazole derivative Os sais testados neste estudo apresentaram certo grau de toxicidade, como mostra a **Tabela 3**, principalmente os compostos (3), (4), (6) e (7). Estes compostos apresentam haleto (Br ou I) na estrutura de suas moléculas, diferente dos compostos que apresentaram valores menores de  $CC_{50}$ , que possuem em sua estrutura um grupo acetóxi (AcO).

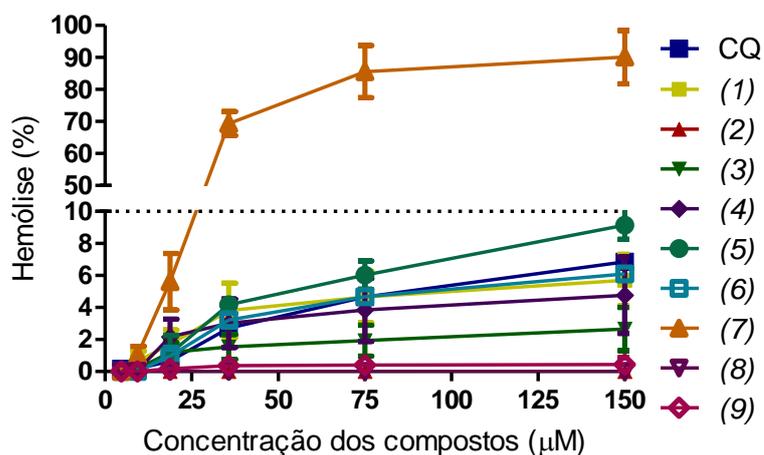
Outra forma de avaliar a toxicidade *in vitro* dos compostos foi realizada através da análise da capacidade dos compostos de hemolisar hemácias humanas não infectadas. O composto (7) demonstrou pronunciada ação hemolítica, com valor de concentração hemolítica para 50% das células ( $CH_{50}$ ) de  $30,08 \pm 1,07 \mu\text{M}$  (**Tabela 4**). Já os demais compostos, incluindo a CQ, exibiram porcentagem de hemólise inferior a 10%, até na maior concentração testada ( $150 \mu\text{M}$ ), como mostrado na **Figura 10**.

**Tabela 4** - Atividade hemolítica de derivados de 1,2,3-triazóis utilizando eritrócitos humanos em ensaio de hemólise.

| Composto  | $CH_{50}$ ( $\mu\text{M}$ ) (média $\pm$ DP) |
|---|--|
| (1)  | >150,00                                      |
| (2)  | >150,00                                      |
| (3)  | >150,00                                      |
| (4)  | >150,00                                      |
| (5)  | >150,00                                      |
| (6)  | >150,00                                      |

|     |   |              |
|-----|---|--------------|
| (7) |  | 30,08 ± 1,07 |
| (8) |  | >150,00      |
| (9) |  | >150,00      |
| CQ  |   | >150,00      |

DP: desvio padrão

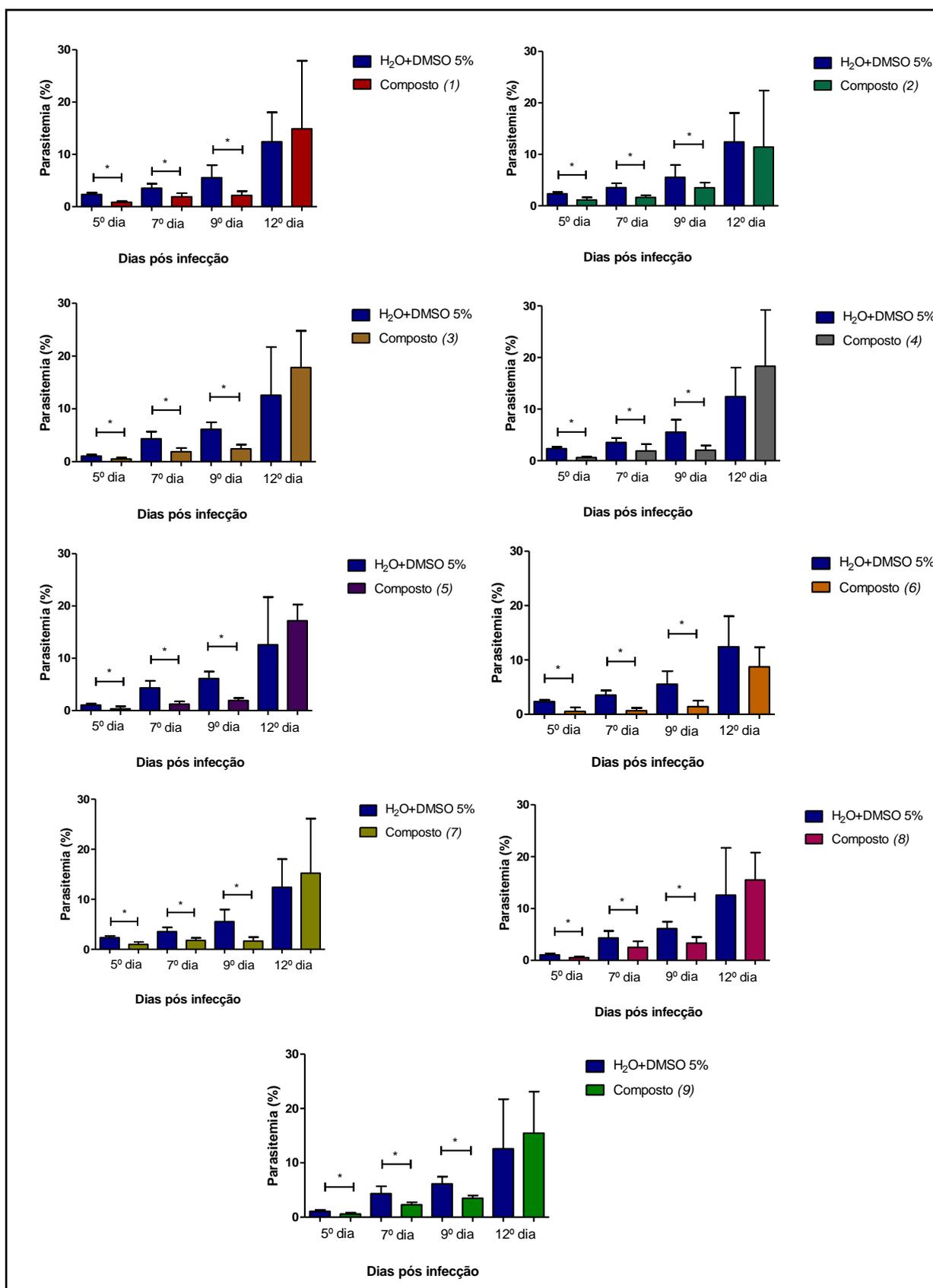


**Figura 10** - Atividade hemolítica dos derivados de 1,2,3-triazol e CQ, nas concentrações de 4,7; 9,4; 18,7; 37,5; 75 e 150 µM, frente a hemácias humanas não infectadas. Resultado representado em média ± desvio padrão.

### 5.3 TESTES *in vivo*

#### 5.3.1 Avaliação da atividade antimalárica

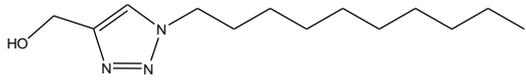
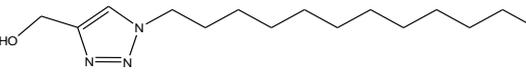
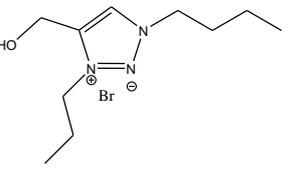
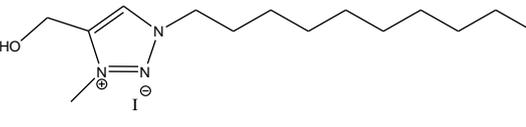
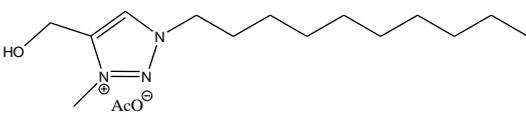
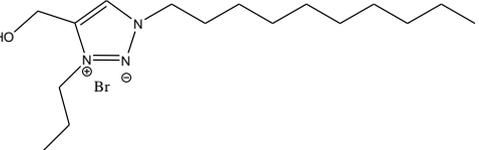
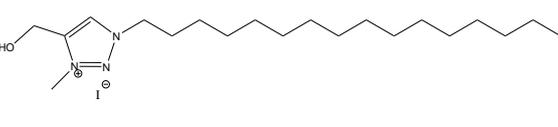
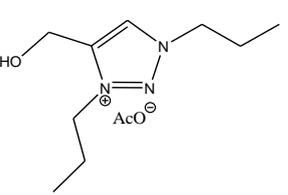
Todos os compostos testados apresentaram uma redução da parasitemia estatisticamente significativa se comparados ao controle negativo do experimento, com exceção do 12º dia para todos os compostos (**Figura 11**).

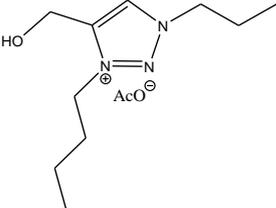


**Figura 11** – Média das parasitemias nos grupos tratados com sais derivados de 1,2,3-triazóis 1,3,4-trissubstituídos, nos dias pós-infecção. n = 5 camundongos por grupo (exceto grupo do composto (9) onde n = 4 camundongos). \* p < 0,05.

Para avaliar a atividade dos compostos utilizou-se como parâmetro a inibição da multiplicação do parasito (IMP), que considera o valor de parasitemia do grupo controle negativo (H<sub>2</sub>O + DMSO 5%) em relação aos grupos-teste (**Tabela 5**). Grupos de compostos-teste que obtiveram valores de supressão superiores a 30% foram considerados ativos como antimaláricos (KRETTLI, ADEBAYO e KRETTLI, 2009).

**Tabela 5** - Inibição da multiplicação do parasito nos grupos de camundongos tratados com derivados de 1,2,3-triazóis na dose de 10 mg/Kg.

| Composto <sup>a</sup>   | Inibição da multiplicação do parasito (%) / Dias após infecção |        |        |       |
|---|--|--------|--------|-------|
|   | 5°   | 7°     | 9°     | 12°   |
| <b>CQ</b>   | 91,92*   | 94,67* | 76,40* | 25,10 |
| (1)    | 63,95*   | 56,70* | 60,83* | 0,00  |
| (2)   | 51,07*   | 53,95* | 36,46* | 0,00  |
| (3)  | 51,64*   | 56,72* | 60,18* | 0,00  |
| (4)  | 73,82*   | 46,89* | 63,18* | 0,00  |
| (5)  | 67,70*   | 71,80* | 68,41* | 0,00  |
| (6)  | 76,82*   | 81,07* | 74,55* | 29,65 |
| (7)  | 57,94*   | 49,15* | 69,86* | 0,00  |
| (8)  | 48,92*   | 42,46* | 45,51* | 0,00  |

|     |   |        |        |        |      |
|-----|---|--------|--------|--------|------|
| (9) |  | 45,42* | 47,45* | 43,23* | 0,00 |
|-----|---|--------|--------|--------|------|

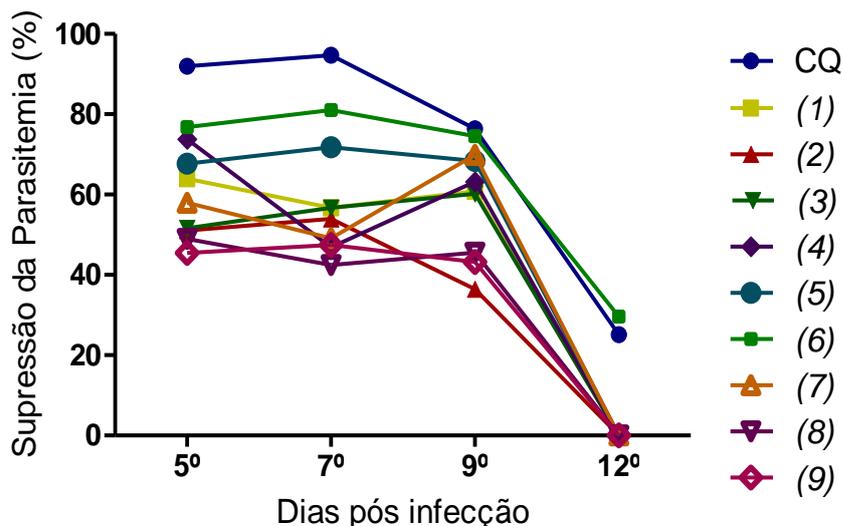
<sup>a</sup> n = 5 camundongos por grupo (exceto grupo do composto (9) onde n = 4 camundongos).

\* p < 0,05 em relação ao controle negativo.

Os valores de inibição da multiplicação do parasito mostram que todos os compostos foram ativos no 5<sup>o</sup>, 7<sup>o</sup> e 9<sup>o</sup> dias pós-infecção. Os compostos (1), (4), (5) e (6) apresentaram notáveis valores de IMP, sendo superior a 50% na maioria dos casos, chegando à supressão de parasitemia em torno de 60% no primeiro dia avaliado (**Figura 12**). Todos estes compostos tem em comum uma cadeia composta por 10 átomos de carbono ligada à posição 1 do anel triazólico, podendo esta estrutura da molécula estar relacionada a uma melhoria na atividade dos derivados de 1,2,3-triazóis.

Dos compostos que apresentam uma cadeia formada por 10 carbonos na posição 1 do anel (4), (5) e (6) demonstraram melhor atividade antimalárica. Estes compostos são sais derivados de 1,2,3-triazóis, diferente do composto (1) que não é um sal, indicando que aparentemente os sais tem melhor atividade. Dentre os sais derivados de 1,2,3-triazóis destaca-se o composto (6) como mais ativo, que se difere dos demais devido a presença de um átomo de bromo (Br) em sua estrutura.

Os compostos (2) e (7) possuem cadeia ligada a posição 1 do anel mais longas, com 12 e 16 átomos de carbono respectivamente. O composto (7) se mostrou mais ativo que (2). Os valores superiores de supressão da parasitemia de (7) em relação a (2) pode estar relacionado ao maior número de carbonos ligados ao anel, além de (7) ser um sal, o que pode também influenciar na sua melhor atividade.



**Figura 12** - Supressão da parasitemia dos camundongos infectados com *P. berghei* e tratados com derivados de 1,2,3-triazóis e com CQ. n = 5 camundongos por grupo (exceto grupo do composto (9) onde n = 4 camundongos).

Os derivados de 1,2,3-triazóis (3), (8) e (9) apresentam uma cadeia carbônica ligada a posição 1 do anel mais curta que os demais derivados, com 4 átomos de carbono no composto (3), e 3 átomos de carbono nos compostos (8) e (9). Dentre estes compostos (3) apresentou-se mais ativo, podendo sua melhor atividade estar relacionada com uma cadeia carbônica mais longa ligada a posição 1 do anel que os demais. Além disso, a presença do bromo na estrutura do composto pode também estar favorecendo a atuação antiplasmodial do composto.

(8) e (9) são os derivados que demonstraram menor atividade, dentre todos os compostos avaliados, o que reforça a ideia de que cadeia carbônica mais longa está relacionada com o aumento da atividade antimalárica de derivados de 1,2,3-triazóis.

### 5.3.2 Sobrevida

Os compostos testados não apresentaram significativo aumento da média de sobrevida dos camundongos quando comparados ao controle negativo (**Tabela 6**). Apesar dos compostos terem apresentado atividade contra *P. berghei* nos primeiros dias avaliados, no último dia não se mostraram ativos. Essa perda de atividade dos compostos e aumento da parasitemia pode ter possível relação com a falta de atuação no prolongamento do tempo de vida dos camundongos, quando

comparados ao controle negativo. Além disso, a dose dos compostos, utilizadas no tratamento, pode ter sido insuficiente para promover a cura e aumento na sobrevivência dos animais.

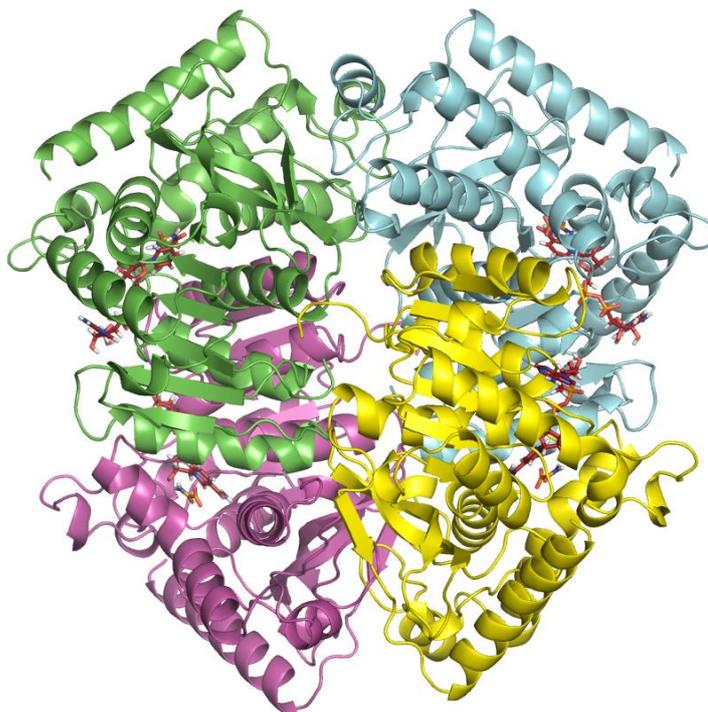
**Tabela 6** – Sobrevivência dos camundongos infectados por grupo.

| Composto <sup>a</sup> | Dias pós-infecção (número de animais vivos/número total de animais no grupo) |     |     |     |     |     |     |     |
|-----------------------|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|                       | 12   | 15  | 18  | 21  | 23  | 25  | 27  | 30  |
| H <sub>2</sub> O+DMSO | 5/5  | 5/5 | 4/5 | 2/5 | 2/5 | 2/5 | 2/5 | 2/5 |
| <b>CQ</b>             | 5/5  | 5/5 | 5/5 | 4/5 | 3/5 | 3/5 | 3/5 | 1/5 |
| <b>(1)</b>            | 5/5  | 5/5 | 4/5 | 4/5 | 2/5 | 2/5 | 2/5 | 2/5 |
| <b>(2)</b>            | 5/5  | 5/5 | 2/5 | 1/5 | 1/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 |
| <b>(3)</b>            | 5/5  | 5/5 | 4/5 | 4/5 | 4/5 | 3/5 | 3/5 | 3/5 |
| <b>(4)</b>            | 5/5  | 5/5 | 3/5 | 2/5 | 1/5 | 1/5 | 1/5 | 1/5 |
| <b>(5)</b>            | 5/5  | 5/5 | 5/5 | 5/5 | 4/5 | 3/5 | 3/5 | 3/5 |
| <b>(6)</b>            | 5/5  | 5/5 | 2/5 | 1/5 | 1/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 |
| <b>(7)</b>            | 5/5  | 5/5 | 3/5 | 3/5 | 2/5 | 2/5 | 1/5 | 1/5 |
| <b>(8)</b>            | 5/5  | 5/5 | 4/5 | 3/5 | 3/5 | 3/5 | 3/5 | 3/5 |
| <b>(9)</b>            | 4/4  | 4/4 | 3/4 | 2/4 | 2/4 | 2/4 | 2/4 | 2/4 |

<sup>a</sup> n = 5 camundongos por grupo (exceto grupo do composto (9) onde n = 4 camundongos).

### 5.3 ESTUDOS DE DOCKING MOLECULAR

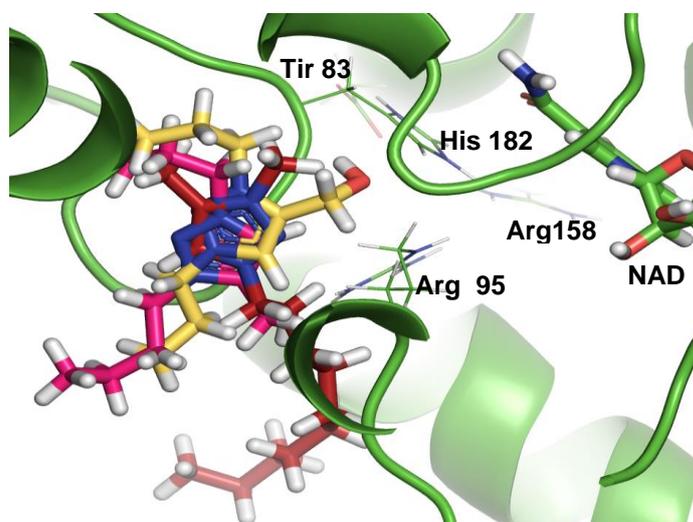
A partir do programa PyMOL, versão 1.4.1, foi gerada a imagem da estrutura tridimensional da enzima LDH de *P. berghei* (*PbLDH*), em conformação de homotetrâmero, mostrada na **Figura 13**.



**Figura 13** - Estrutura tridimensional da enzima LDH de *P. berguei* contendo o substrato oxamato e cofator NAD, obtidos pelo programa PyMOL versão 1.4.1.

Os compostos que apresentaram melhor atividade antimalárica *in vivo* foram selecionados e preparados para serem realizados os estudos de docking molecular, com o intuito de pesquisar se a enzima acima poderia ser o alvo de ação desses compostos.

Um docking inicial com a enzima contendo o cofator NAD em seu sítio catalítico mostrou que os compostos apresentaram baixa afinidade ao se ligarem a *PbLDH* no sítio selecionado (**Figura 14**).



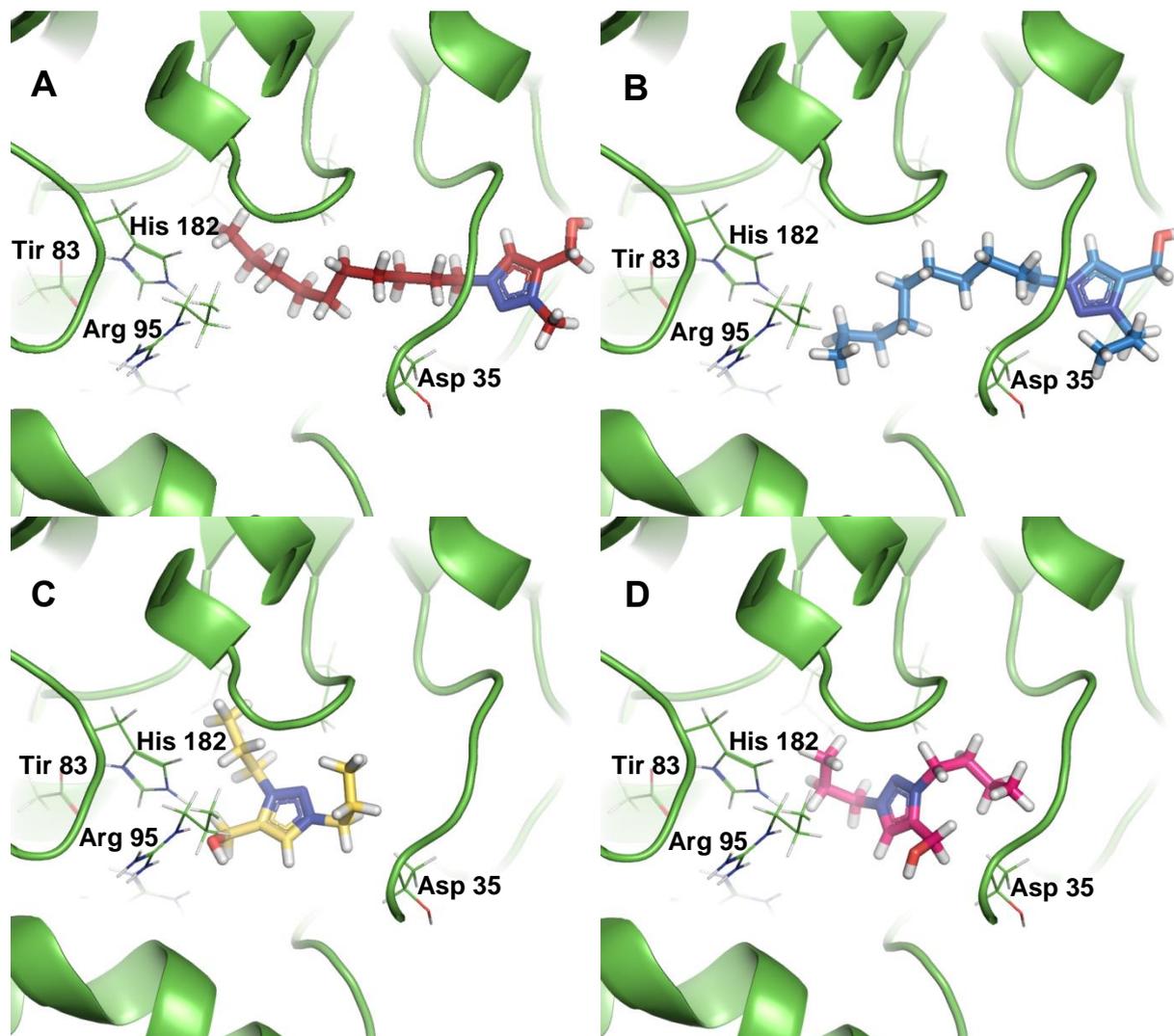
**Figura 14** - Representação gráfica do docking molecular entre a *PbLDH*, o cofator NAD e os compostos (5), (8) e (9). Figura gerada pelo PyMOL versão 1.4.1.

Em seguida o docking foi realizado com os compostos (5) e (6), que apresentaram melhor atividade antimalárica *in vivo*, com a enzima sem seu cofator. Porém os resultados obtidos não seguiram como o esperado, os compostos selecionados apresentaram baixa afinidade de ligação com o sítio do NAD. Esta baixa afinidade de ligação pode estar relacionada com o comprimento alongado da cadeia lateral dos derivados de triazol selecionados. Portanto, foram eleitos os compostos de cadeia mais curta, (8) e (9), para serem submetidos ao docking molecular. Os resultados obtidos pelo pacote 9.3.5 da Schrodinger Maestro e a ferramenta AutoDock Vina versão 1.1.2 são mostrados na **Tabela 7**.

**Tabela 7** – Resultados do docking molecular entre a enzima *PbLDH* e os compostos (5), (6), (8) e (9).

| Composto | Maestro                                   |                            |           | AutoDockVina                          |                     |         |
|----------|---|----------------------------|-----------|---------------------------------------|---------------------|---------|
|          | Glide gscore<br>(kcal.mol <sup>-1</sup> ) | Interações                 | cKI(μM)   | Affinity<br>(kcal.mol <sup>-1</sup> ) | Interações          | cKI(μM) |
| (5)      | -0,805                                    | Lig H:<br>ASP35            | 256914,64 | -4,3                                  | Próxima a<br>HIS182 | 704,78  |
| (6)      | -1,335                                    | Lig H:<br>ASP35            | 105077,29 | -5,4                                  | Próxima a<br>HIS182 | 110,09  |
| (8)      | -3,561                                    | Lig H:<br>HIS182<br>ARG95  | 2454,62   | -5,1                                  | Próxima a<br>HIS182 | 182,66  |
| (9)      | -4,078                                    | Lig H:<br>ASN127<br>SER234 | 1024,43   | -5,4                                  | Lig H:<br>HIS182    | 110,09  |

Os resultados mostram que os compostos (8) e (9) parecem apresentar maior afinidade de ligação quando analisados pelo Schrodinger Maestro 9.3.5. Além disso, o composto (9) apresenta interação com dois resíduos, His 182 e Arg 95, que interagem com o NAD. Já os resultados do AutoDock Vina versão 1.1.2, mostram que os quatro compostos analisados apresentaram afinidade semelhante, interagindo com o mesmo ligante. A **Figura 15** mostra a interação dos compostos (5), (6), (8) e (9) com a *PbLDH*.



**Figura 15** - Representação do docking molecular entre os compostos e a enzima *PbLDH*. (A) Composto (5); (B) Composto (6); (C) Composto (8) e (D) Composto (9). Figura gerada pelo PyMOL versão 1.4.1.

## 6. DISCUSSÃO

Um dos principais fatores que dificulta o controle da malária no mundo é o surgimento de cepas de *Plasmodium* resistentes aos fármacos disponíveis atualmente para o tratamento da doença. O surgimento da resistência aparece principalmente quando ocorre intensa utilização de um fármaco, administração de concentrações inadequadas e uso de monoterapias. A existência de cepas de *P. falciparum* multirresistentes às drogas antimaláricas disponíveis no mercado tem justificado a incessante busca por novas drogas antimaláricas que sejam eficazes e com reduzida toxicidade (COUTO et al., 1995; LEE, SEO e CHO, 2013).

Diversas estratégias estão sendo adotadas para superar o desafio da resistência dos plasmódios aos antimaláricos, como, por exemplo, uso de terapias combinadas, desenvolvimento de análogos de drogas existentes e exploração de novos alvos terapêuticos (ROSENTHAL, 2003). O desenvolvimento de drogas análogas a fármacos disponíveis no mercado mostra-se interessante ao serem empregados no tratamento de outras doenças, podendo levar à identificação de novos alvos moleculares com diferentes indicações terapêuticas, acelerando a descoberta de novos antimaláricos (BORISY et al., 2003).

Neste estudo foram testados derivados de 1,2,3-triazóis. Essa classe de compostos apresenta diversas atividades biológicas descritas. Além disso, trabalhos realizados anteriormente pelo nosso grupo mostrou que compostos associados a 1,2,3-triazóis apresentaram atividade contra parasitos da malária *in vivo*, que incentivaram a síntese de novos compostos testados no presente trabalho.

Fármacos de uso oral facilitam a adesão correta do paciente ao tratamento, pela praticidade de administração, sendo portando a melhor via de administração para novos antimaláricos. A biodisponibilidade de um fármaco de uso oral está intimamente relacionada com a absorção intestinal humana, sendo uma das principais barreiras a ser ultrapassada para o desenvolvimento de um novo composto. Essa etapa envolve uma série de fatores biológicos e físico-químicos, que se relacionam diretamente aos parâmetros farmacocinéticos, como distribuição, absorção, metabolismo, excreção (SUBRAMANIAN et al., 2004).

Um fármaco deve se dissolver e solubilizar no trato gastrointestinal para que seja bem absorvido pela membrana intestinal. Portanto, a solubilidade do composto é importante, já que uma baixa solubilidade é prejudicial para uma boa

absorção. Outra característica importante no estudo da biodisponibilidade é a lipofilicidade dos fármacos, que está associada ao coeficiente de partição água/óleo. Substâncias lipofílicas promovem a passagem pela bicamada lipídica das membranas celulares, levando o fármaco ao acesso ao seu sítio de ação (WATERBEEMD e GIFFORD, 2003; HOU et al., 2007).

A previsão das características físico-químicas nos estágios iniciais possui grande importância no desenvolvimento de candidatos a novos fármacos (DUCHOWICZ et al., 2007). Neste contexto, a Regra de Lipinski foi aplicada para avaliar as características físico-químicas dos compostos testados, quanto à solubilidade e permeabilidade.

Os compostos testados neste estudo seguiram a regra dos cinco, sendo que apenas os derivados (6) e (7), violaram um parâmetro ( $\log P$ ) da regra, estando ainda dentro dos valores permitidos para o número de violações. Esses dados demonstram que os compostos selecionados para o estudo parecem possuir boas propriedades físico-químicas relacionadas à biodisponibilidade, sendo favoráveis para estudos de atividade *in vivo*.

A avaliação da citotoxicidade é essencial na busca de novos fármacos, já que um composto promissor não pode apresentar efeitos indesejáveis aos usuários (NOGUEIRA e DO ROSÁRIO, 2010). Para isso foram realizados ensaios de citotoxicidade (MTT) em macrófagos peritoneais de camundongos Suíços e ensaios de verificação da atividade hemolítica dos compostos em eritrócitos humanos normais não infectados, ambos *in vitro*.

O método MTT, descrito por Pieters e colaboradores (1988), consiste na avaliação da viabilidade celular através do dano mitocondrial, uma vez que a enzima succinato desidrogenase, presente nessa organela ativa, é responsável pela clivagem do sal tetrazólico (MTT) de coloração amarela resultando na formação de cristais de formazan, responsáveis pela coloração roxa, presente nas células vivas. Foi utilizada neste ensaio cultura primária de macrófagos peritoneais murinos. O uso de macrófagos peritoneais em murinos é amplamente difundido devido à facilidade técnica e obtenção de altas concentrações celulares, além do baixo custo.

De acordo com o estudo realizado os compostos que possuem em sua estrutura os ânions  $\text{Br}^-$  e  $\text{I}^-$  apresentaram se mais citotóxicos no ensaio de MTT. Esses resultados são condizentes com estudos de toxicidade realizados por Teeyapant et al., (1993), Maines et al., (2006), Cooper (2007) e Ilin e Nersesyan

(2013), que demonstram que compostos contendo esses ânions se mostraram mais citotóxicos quando comparados a compostos com ausência de Br<sup>-</sup> e I<sup>-</sup>.

Avaliação da atividade hemolítica foi outro método utilizado no estudo para a análise *in vitro* da toxicidade dos compostos. A hemólise pode ocorrer devido a diversos mecanismos, podendo resultar da formação de poros na membrana do eritrócito, modificando sua permeabilidade ou devido à alteração na atividade de ATPases de sódio, potássio e cálcio (HU, KONOKI e TACHIBANA, 1996; MUKHERJEE e RAJASEKARAN, 2010). Quando ocorre a ruptura de eritrócitos há liberação de hemoglobina, que pode causar danos em diversos órgãos vitais tais como fígado, rins e coração, quando se encontra livre no plasma. Portanto, é necessário avaliar a atividade hemolítica para determinação da segurança na busca por novos compostos farmacológicos (BEDNARCZUK et al., 2010; DAVANÇO et al., 2014).

Apenas um derivado de 1,2,3-triazol, composto (7), apresentou capacidade hemolítica, enquanto todos os outros compostos se mostraram seguros, com valores de porcentagem de hemólise próximos a CQ nas concentrações de 4,7 a 150 µM analisadas. O composto (7) possui em sua estrutura a cadeia carbônica mais longa ligada ao anel, apresentando-se mais apolar que os demais compostos. A presença de um anel hidrofílico e uma cadeia mais lipofílica que os demais compostos, podem estar garantindo ao derivado (7) propriedades detergentes e surfactantes, como a saponina, que levam a lise da membrana de eritrócitos.

Os ensaios de toxicidade são preconizados para análise da segurança na triagem de novos compostos. Os métodos *in vitro* tem sido os mais utilizados nos dias atuais, devido à preocupação com o uso extensivo de animais em experimentação (VALADARES, 2006; BEDNARCZUK et al., 2010). O uso de culturas de células tem se tornado um modelo muito apreciado na avaliação de citotoxicidade de compostos, pois são reprodutíveis, sensíveis e rápidos (BUCKBERRY, 1999).

Apesar de os métodos *in vitro* apresentarem vantagens em relação aos *in vivo*, como poder limitar o número de variáveis experimentais, obter dados mais facilmente e serem realizados em tempo mais curto, há o problema da extrapolação dos dados obtidos *in vitro* para a aplicação clínica *in vivo*. Isso ocorre, pois os compostos administrados passam por processos de solubilização, absorção,

metabolismo que não são reproduzidos *in vitro* (ROGERO et al., 2003; MORALES, 2008).

No estudo a maioria dos compostos se mostrou segura em pelo menos um dos testes utilizados para avaliar a citotoxicidade, com exceção do derivado (7). No entanto, como dito anteriormente, há uma dificuldade de extrapolação de dados de citotoxicidade *in vitro* para o modelo animal. Os compostos foram então avaliados quanto a sua atividade antimalárica *in vivo*. O grupo de animais tratados com o composto (7) quando analisados quanto à sobrevivência *in vivo*, não apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo tratado com CQ, medicamento conhecidamente seguro.

Para a descoberta de novos antimaláricos, a utilização de estudos com parasito de roedores tem sido um modelo *in vivo* amplamente utilizado para testes de atividade farmacológica (FERREIRA-DA-CRUZ et al., 2000). Quatro espécies de parasitos de malária extraídos de roedores africanos foram adaptadas para o crescimento em camundongos: *P. berghei*, *P. chabaudi*, *P. vinckei* e *P. yoelii* (NOGUEIRA e DO ROSÁRIO, 2010). As vantagens que levam a utilização do modelo murino para estes estudos incluem a facilidade de manuseio e de criação de ratos e camundongos em laboratório, a necessidade de pequena quantidade de drogas devido ao seu pequeno porte, a utilização de espécies de parasitos que não infectam humanos, fácil manutenção do parasito e principalmente a eficiência nos testes para a triagem compostos com atividade antimalárica (KRETTLI, ADEBAYO e KRETTLI, 2009; JIMÉNEZ-DÍAZ et al., 2013).

O uso de testes *in vivo* apresenta grande importância na busca por novos antimaláricos, pois permitem avaliar os processos relacionados à físico-química dos compostos em organismos vivos. Nesta metodologia é possível avaliar fatores como a depuração dos parasitos, detectados por meio de microscopia ótica ou outros métodos mais sensíveis; o tempo gasto entre a última dose da droga e a depuração da parasitemia, e a dosagem da droga que depura os parasitas como resposta a sua utilização. Com esses dados, pode-se obter resultados mais fidedignos em comparação com modelos *in vitro* de avaliação da atividade antiplasmodial de compostos (NOGUEIRA e DO ROSÁRIO, 2010).

Dentre as espécies de parasitos de roedores, o *P. berghei* se mostra muito eficiente para estudos de atividade antimalárica. A infecção de camundongos com esta espécie é um modelo válido para rastrear drogas com potencial uso na

malária humana sendo, portanto, o modelo escolhido para o estudo (WHO, 1973; PETERS, PORTUS e ROBINSON, 1975).

O teste supressivo de quatro dias, descrito por Peters (1965), é o teste mais utilizado para a avaliação da atividade antimalárica de novos compostos, por se tratar de um teste simples, de fácil realização e por apresentar boa representatividade da atividade dos compostos. No teste supressivo de quatro dias os animais são inoculados com o parasito por via intraperitoneal, tratados diariamente durante 4 dias consecutivos a partir do dia da infecção e depois examinados quanto à eficácia dos novos compostos, no dia 5 após infecção, por comparação das parasitemias, entre animais tratados e não tratados.

No presente estudo foi utilizado o teste supressivo modificado, pois a parasitemia dos animais utilizados no experimento foi avaliada não apenas no dia 5 após a infecção, mas também nos dias 7, 9 e 12 do experimento. A avaliação da parasitemia por um período mais prolongado nos permitiu visualizar características físico-químicas, como tempo necessário para início da ação e a possível meia vida dos compostos. A utilização da via oral para a administração do fármaco no estudo foi escolhida por esta via refletir o modo de utilização dos antimaláricos pela maior parte da população de países endêmicos (RAY et al., 2010).

Com relação à análise da estrutura-atividade dos compostos derivados de 1,2,3-triazóis vemos que os compostos que apresentaram melhor atividade foram (1), (4), (5) e (6), que possuem em comum a presença de uma cadeia carbônica, ligada a posição 1 do anel triazólico, formada por 10 átomos de carbono.

Apesar de serem ativos, os compostos que apresentaram menor atividade foram (3), (8) e (9). Esses compostos apresentam as menores cadeias carbônicas ligadas a posição 1 do anel, garantindo a essas moléculas menor lipofilicidade, que pode estar relacionada com uma dificuldade de estes atravessarem a membrana plasmática, o que pode dificultar os compostos a chegarem ao seu sítio de ação.

Segundo Pereira (2007) é fundamental que haja um balanço adequado entre solubilidade em água e lipofilicidade para que ocorra a absorção passiva de fármacos. Compostos muito hidrofílicos tendem a apresentar baixa biodisponibilidade, devido a baixas permeabilidades pelas membranas celulares. A baixa biodisponibilidade também pode ocorrer em compostos muito apolares que possuem baixa solubilidade em água, prejudicando a dissolução destes compostos no meio biológico.

Dentre o grupo de compostos que possuem uma cadeia formada por 10 átomos de carbono os sais derivados de 1,2,3-triazóis, (4), (5) e (6) apresentaram maior atividade que (1), que não é um sal. A formação de sais aumenta as taxas de solubilidade e dissolução de drogas (BERGE, BIGHLEY e MONKHOUSE, 1977; SERAJUDDIN, 2007; GLANZNER e SILVA, 2010), melhorando com isso a biodisponibilidade destes compostos, podendo ser uma possível explicação para que os sais tenham demonstrado atividade superior.

Os compostos testados neste trabalho não foram capazes de prolongar a sobrevivência dos animais tratados, quando comparados ao controle não tratado. Este resultado pode ser explicado pela perda de atividade dos compostos no 12º dia de experimento, que levou ao aumento da parasitemia dos camundongos e, possivelmente, a morte dos animais.

Estudos de biodisponibilidade realizados com derivados de 1,2,3-triazóis mostram que esses compostos apresentam meia vida de cerca de 30h (PEREIRA, 2007). Como a atividade antimalárica foi avaliada até 8 dias (12º dia pós infecção) após a última administração dos compostos, pode ter ocorrido a excreção destes do organismo dos camundongos. Além disso, uma das explicações pode estar relacionada com uma dosagem insuficiente dos compostos no tratamento dos camundongos. A dose utilizada no experimento não foi capaz de eliminar todos os parasitos, fazendo com que os poucos parasitos que sobreviveram se multiplicassem após o fim do período de administração dos compostos.

Apesar de considerável atividade de supressão da parasitemia pelos compostos testados, a sua administração não levou a cura dos camundongos, uma possível explicação pode ser a necessidade de utilização de tratamentos mais prolongados ou com doses mais elevadas, que possibilitem a cura dos animais.

De maneira geral o estudo mostrou que todos os nove compostos avaliados demonstraram atividade antimalárica nos dias 5, 7 e 9 após a infecção, apresentando valores de supressão da parasitemia superiores a 30%. Há relatos na literatura de que derivados de 1,2,3-triazóis apresentam diversas atividades biológicas, sendo a atividade antimalárica descrita em vários trabalhos (BAKUNOV et al., 2010; PATIL et al., 2010; SINGH et al., 2011; BOECHAT et al., 2014; HAMANN et al., 2014; MCCONVILLE et al., 2015; SANTOS et al., 2016).

Existem alguns possíveis mecanismos já descritos para atuação dessa classe de compostos como antimaláricos. Segundo Patil et al. (2010) compostos

associados a 1,2,3-triazóis podem atuar inibindo a enzima histona diacetilase em protozoários, como o da malária, levando a sua morte. Já McConville et al. (2015), descreve que carbomil triazóis atuam como potenciais inibidores de serina proteases, que são conhecidas por serem essenciais para o desenvolvimento do parasito nos estágios eritrocítico e exoeritrocítico. Cameron e colaboradores foram os primeiros a descrever, em 2004, a atuação de diversos azóis na inibição da enzima LDH de *Plasmodium* (CAMERON et al., 2004).

A partir dos estudos realizados por Cameron et al. (2004) diversos estudos surgiram relacionando a atuação de triazóis e inibição da enzima LDH. Sugere-se que a ação destes compostos ocorra devido à sua semelhança estrutural com NADH, o cofator da enzima, e competição de ambos por seu sítio de ação, levando a inibição da LDH, essencial para a produção de energia e sobrevivência do parasito (GRANCHI et al., 2010; PENNA-COUTINHO et al., 2011).

Para se determinar o possível mecanismo de ação dos compostos testados foram realizados estudos de docking molecular. Os compostos mais ativos foram avaliados quanto a sua ligação à enzima LDH de *P. berghei*, espécie utilizada no presente estudo para avaliação da atividade antimalárica em modelo murino.

O docking molecular é um estudo computacional que pode ser utilizado em diversas fases da concepção de novas drogas, como na busca por alvos de ação (ELOKELY e DOERKSEN, 2013). Os resultados obtidos no docking molecular mostram que os compostos mais ativos apresentaram ligação a um ou dois resíduos do sítio catalítico da enzima de *P. berghei*. Os compostos apresentaram baixa afinidade de ligação, que pode indicar que estes derivados têm baixa probabilidade de se ligarem a enzima estudada, indicando que este talvez não seja o alvo de ação destes compostos.

Estudos de docking molecular com novos alvos de ação devem ser realizados para se determinar o possível mecanismo de ação dos compostos testados neste estudo.

## 7. CONCLUSÕES

- Análise das propriedades físico-químicas *in silico* baseada na regra de Lipinski mostrou que os compostos selecionados para o estudo parecem possuir boas propriedades físico-químicas relacionadas à biodisponibilidade, sendo favoráveis para estudos de atividade *in vivo*.
- Os compostos (3), (4), (6) e (7) apresentaram citotoxicidade quando avaliados pelo método MTT, porém apenas o composto (7) foi tóxico quando avaliado pelo ensaio de hemólise. Embora algumas drogas tenham se mostrado citotóxicas *in vitro*, *in vivo* parecem não se comportarem como tóxicas.
- Todos compostos testados no estudo apresentaram atividade antimalárica contra *P. berghei* NK65 *in vivo* nos primeiros dias analisados, com valores de supressão da parasitemia superiores a 30%.
- Os compostos (1), (4), (5) e (6) tiveram os maiores valores de IMP, sendo superior a 50% na maioria dos casos. Todos esses compostos possuem em comum a presença de uma cadeia composta por 10 átomos de carbono ligada a posição 1 do anel triazólico, que pode estar relacionada com a melhor atividade dos compostos.
- A perda de atividade dos compostos no 12º dia pós-infecção pode estar relacionada com o tempo de meia vida e a dose utilizada dos derivados de 1,2,3-triazol.
- Os compostos testados não foram capazes de prolongar o tempo de vida dos animais possivelmente por perda da atividade, podendo indicar a necessidade de doses mais elevadas ou de tratamentos prolongados.
- A LDH parece não ser o melhor alvo para os derivados de 1,2,3-triazóis que mostraram boa atividade antimalárica neste estudo.
- Tendo em vista os bons resultados obtidos neste trabalho, os derivados merecem ser objeto de futuras investigações.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.144, p. 1-12, 2011.

ADITYA, N. P.; VATHSALA, P. G.; VIEIRA, V.; MURTHY, R. S.; SOUTO, E. B. Advances in nanomedicines for malaria treatment. *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 201–202, p. 1–17, 2013.

AHER, N. G.; PORE, V. S.; MISHRA, N. N.; KUMAR, A.; SHUKLA, P. K.; SHARMA, A.; BHAT, M. K. Synthesis and antifungal activity of 1,2,3-triazole containing fluconazole analogues. *Bioorg Med Chem Lett*, v. 19, n. 3, p. 759-63, 2009.

ALECRIM, M. G. C.; ALECRIM, W.; MACEDO, V. 1999. Plasmodium vivax resistance to chloroquine (R2) and mefloquine (R3) in Brazilian Amazon region. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 28, n. 4, p. 357-65, 1999.

AMINO, R.; THIBERGE, S.; MARTIN B.; CELLI, S.; SHORTE, S.; FRISCHKNECHT, F.; MENARD, R. Quantitative imaging of Plasmodium transmission from mosquito to mammal. *Nature Medicine*, v. 12, n. 2, p. 220-4, 2006.

ANDRADE-NETO, V. F.; BRANDAO, 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. 253-6, 2003.

BAI, H.; GELMAN, D. B.; PALLI, S. R. Mode of action of methoprene in affecting female reproduction in the African malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. *Pest Manag Sci*, v. 66, p. 936-43, 2010.

BAIRD, J. K. Chloroquine Resistance in Plasmodium vivax. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 48, n. 11, p. 4075-83, 2004.

BAIRD, J. K.; HOFFMAN, S. L. Primaquine Therapy for Malaria. *Clin Infect Dis.*, v. 39, n. 9, p. 1336-45, 2004.

BAKUNOV, S. A.; BAKUNOVA, S. M.; WENZLER, T.; GHEBRU, M.; WERBOVETZ, K. A.; BRUN, R.; TIDWELL, R. R. Synthesis and antiprotozoal activity of cationic 1,4-diphenyl-1H-1,2,3-triazoles. *J Med Chem*, v. 53, n. 1, p. 254-72, 2010.

BARIK, T. K.; SAHU, B.; SWAIN, V. A review on *Anopheles culicifacies*: from bionomics to control with special reference to Indian subcontinent. *Acta Tropica*, v. 109, p. 87-97, 2009.

BARTOLONI, A. e ZAMMARCHI, L. Clinical Aspects of Uncomplicated and Severe Malaria. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*, v. 4, n. 1, p. e2012026, 2012.

BEDNARCZUK, V. O.; Verdam, M. C. S.; Miguel, M. D.; Miguel, O. G. Testes in vitro e in vivo utilizados na triagem toxicológica de produtos naturais. *Visão Acadêmica*, v. 11, 2010.

BERGE, S. M.; BIGHLEY, L. D.; MONKHOUSE, D. C. Pharmaceutical salts. *J. Pharm. Sci.*, v. 74, p. 815–20, 1977.

BIAMONTE, M. A.; WANNER, J.; LE ROCH, K. G. Recent advances in malaria drug discovery. *Bioorg Med Chem Lett*, v. 23, p. 2829-43, 2013.

BIRKETTA, A. J.; MOORTHYB, V. S.; LOUCQC, C.; CHINTISD, C. E.; KASLOA, D. C. Malaria vaccine R&D in the Decade of Vaccines: Breakthroughs, challenges and opportunities. *Vaccine*, v. 31, p. B233-43, 2013.

BOECHAT, N.; FERREIRA, M. L.; PINHEIRO, L. C.; JESUS, A. M.; LEITE, M. M.; JÚNIOR, C. C.; AGUIAR, A. C.; DE ANDRADE, I. M.; KRETTLI, A. U. New compounds hybrids 1h-1,2,3-triazole-quinoline against *Plasmodium falciparum*. *Chem Biol Drug Des*, v. 84, n. 3, p. 325-32, 2014.

BOUCHAUD, O.; IMBERT, P.; TOUZE, J. E.; DODOO, A. N.; DANIS, M.; LEGROS, F. Fatal cardiotoxicity related to halofantrine: a review based on a worldwide safety data base. *Malaria Journal*, v. 8, n. 289, p. 1-8, 2009.

BRASIL. Portal da saúde, 2015. Ministério da Saúde lança Plano de Eliminação da malária no Brasil. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/20609-ministerio-da-saude-lanca-plano-de-eliminacao-da-malaria-no-brasil> Acesso em: 22/12/2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Manual de Diagnóstico Laboratorial da Malária. 2º ed., Brasília, DF, 2009.

BRAY, P. G.; MUNGTHIN, M.; RIDLEY, R. G.; WARD, S. A. Access to hemozoin: the basis of chloroquine resistance. *Mol Pharmacol*, v. 54, p. 170-9, 1998.

BRUNTON, L.L.; LAZO, J.S.; PARKER, K.L. Goodman & Gilman – As Bases Farmacológicas da Terapêutica. 11ª ed., Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2006.

BUCKBERRY, L. D. Cytotoxicity Testing Using Cell Lines. In: *Methods in Biotechnology, Animal Cell Biotechnology*. New York: Humana Press, v. 8, p. 239-52, 1999.

BUTLER, A. R.; KHAN, S.; FERGUSON, E. A brief history of malaria chemotherapy. *J R Coll Physicians Edinb*, v. 40, n. 2, p. 172-7, 2010.

CAMERON, A.; READ, J.; TRANTER, R.; WINTER, V. J.; SESSIONS, R. B.; BRADY, R. L.; VIVAS, L.; EASTON, A.; KENDRICK, H.; CROFT, S. L.; BARROS, D.; LAVANDERA, J. L.; MARTIN, J. J.; RISCO, F.; GARCÍA-OCHOA, S.; GAMO, F. J.; SANZ, L.; LEON, L.; RUIZ, J. R.; GABARRÓ, R.; MALLO, A.; GÓMEZ, H, F. Identification and activity of a series of azole-based compounds with lactate dehydrogenase-directed anti-malarial activity. *J Biol Chem*, v. 279, n. 30, p. 31429-39, 2004.

CARVALHO, L. H.; BRANDAO, M. G. L.; SANTOS, D.; LOPES, J. L. C.; KRETTLI, A. U. Antimalarial activity of crude extracts from brazilian plants studied *in vivo* in *Plasmodium berghei*-infected mice *in vivo* and *in vitro* against *Plasmodium falciparum* in culture. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 24, p. 1113-23, 1991.

CASAGRANDE, M.; BASILICO, N.; PARAPINI, S.; ROMEO, S.; TARAMELLI, D.; SPARATORE, A. Novel amodiaquine congeners as potent antimalarial agents. *Bioorg Med Chem*, v. 16, n. 14, p. 6813-23, 2008.

CHENG, M. P. e YANSOUNI, C. P. Management of Severe Malaria in the Intensive Care Unit. *Crit Care Clin*, v. 29, n. 4, p. 865-85, 2013.

COOPER, R. A. Iodine revisited. *Int Wound J*, v. 4, n. 2, p. 124-37, 2007.

CORDEIRO, R. S.; CUNHA, F. Q.; FILHO, J. A.; FLORES, C. A.; VASCONCELOS, H. N.; MARTINS, M. A. *Plasmodium berghei*: physiopathological changes during infections in mice. *Ann Trop Med Parasitol*, v. 77, n. 5, p. 455-65, 1983.

CORRALES, R. C. N. R.; DE SOUZA, N. B.; PINHEIRO, L. S.; ABRAMO, C.; COIMBRA, E. S.; DA SILVA, A. D. Thiopurine derivatives containing triazole and steroid: Synthesis, antimalarial and antileishmanial activities. *Biomed Pharm*, v. 56, n. 3, p. 198-203, 2011.

COSTA, M. S.; BOECHAT, N.; RANGEL, E. A.; DA SILVA, F. C.; DE SOUZA, A. M.; RODRIGUES, C. R.; CASTRO, H. C.; JUNIOR, I. N.; LOURENÇO, M. C.; WARDELL, S. M.; FERREIRA, V. F. Synthesis, tuberculosis inhibitory activity, and SAR study of N-substituted-phenyl-1,2,3-triazole derivatives. *Bioorg Med Chem*, v. 14, n. 24, p. 8644-53, 2006.

COUTO, A. A.; CALVOSA, V. S.; SANTOS, M. A.; SOUZA, J. M. Evolução temporal da resistência *in vitro* do *plasmodium falciparum* às drogas antimaláricas em duas áreas da amazônia brasileira com distintas características sócio-econômicas e geográficas. *Rev Soc Bras Med Trop*, v. 28, n. 4, p. 357-65, 1995.

COWMAN, A. F.; BERRY, D.; BAUM, J. The cellular and molecular basis for malaria parasite invasion of the human red blood cell. *J Cell Biol*, v. 198, n. 6, p. 961-71, 2012.

COWMAN, A. F.; KARCZ, S.; GALATIS, D.; CULVENOR, J. G. P-glycoprotein homologue of *Plasmodium falciparum* is localized on the digestive vacuole. *J Cell Biol*, v. 113, p. 1033-42, 1991.

CROFT, A. M. A lesson learnt: the rise and fall of Lariam and Halfan. *J R Soc Med*, v. 100, n. 4, p. 170-4, 2007.

CUI, L.; MHARAKURWA, S.; NDIAYE, D.; RATHOD, P. K.; ROSENTHAL, P. J. Antimalarial Drug Resistance: Literature Review and Activities and Findings of the ICEMR Network. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 93, Supl. 3, p. 57-68, 2015.

CUI, L.; SU, X. Discovery, mechanisms of action and combination therapy of artemisinin. *Expert review of anti-infective therapy*, v. 7, n. 8, p. 999-1013, 2009.

CUNICO, W.; CARVALHO, S. A.; GOMES, C. R. B.; MARQUES, G. H. Fármacos antimalariais – história e perspectivas. *Rev. Bras. Farm.*, v. 89, n. 1, p. 49-55, 2008.

DANESHVAR, C.; DAVIS, T. M.; COX-SINGH, J.; RAFA'EE, M. Z.; ZAKARIA, S. K.; DIVIS, P. C.; SINGH, B. Clinical and Laboratory Features of Human *Plasmodium knowlesi* Infection. *Clin Infect Dis*, v. 49, p. 852-860, 2009.

DAVANÇO, M. G.; AGUIAR, A. C.; DOS SANTOS, L. A.; PADILHA, E. C.; CAMPOS, M, L.; DE ANDRADE, C. R.; DA FONSECA, L. M.; DOS SANTOS, J. L.; CHIN, C. M.; KRETTLI, A. U.; PECCININI, R. G. Evaluation of antimalarial activity and toxicity of a new pro-maquine prodrug. *PLoS one*, v. 9, n. 8, 2014.

DEMBELE, L.; GEGO, A.; ZEEMAN, A. M.; FRANETICH, J. F.; SILVIE, O.; RAMETTI, A.; LE GRAND, R.; DEREUDDRE-BOSQUET, N.; SAUERWEIN, R.; VAN GEMERT, G. J.; VAILLANT, J. C.; THOMAS, A. W.; SNOUNOU, G.; KOCKEN, C. H.; MAZIER, D. Towards an in vitro model of *Plasmodium* hypnozoites suitable for drug discovery. *PLoS One*, v. 6, n. 3, p. e18162, 2011.

DEMARAY, J. A.; THUENER, J. E.; DAWSON, M. N.; SUCHECK, S. J. Synthesis of triazole-oxazolidinones via a one-pot reaction and evaluation of their antimicrobial activity. *Bioorg Med Chem Lett*, v. 18, n. 17, p. 4868-71, 2008.

DERBYSHIRE, E. R.; PRUDÊNCIO, M.; MOTA, M. M.; CLARDYA, J. Liver-stage malaria parasites vulnerable to diverse chemical scaffolds. *PNAS*, v. 109, n. 22, p. 8511-6, 2012.

DING, X. C.; BECK, H. P.; RASO, G. 2011. *Plasmodium* sensitivity to artemisinins: magic bullets hit elusive targets. *Trends Parasitol*, v. 27, n. 2, p. 73-81, 2012.

DJIMDÉ, A.; DOUMBO, O. K.; CORTESE, J. F.; KAYENTAO, K.; DOUMBO, S.; DIOURTE, Y.; COULIBALY, D.; DICKO, A.; SU, X. Z.; NOMURA, T.; FIDOCK, D. A.; WELLEMS, T. E.; PLOWE, C. V. A molecular marker for chloroquine-resistant falciparum malaria. *The New England Journal of Medicine*, v. 344, n. 4, p. 257-63, 2001.

DONDORP, A. M.; FAIRHURST, R. M.; SLUTSKER, L.; MACARTHUR, J. R.; BREMAN, J. G.; GUERIN, P. J.; WELLEMS, T. E.; RINGWALD, P.; NEWMAN, R. D.; PLOWE, C. V. The Threat of Artemisinin-Resistant Malaria. *The New England Journal of Medicine*, v. 365, n. 12, p. 1073-5, 2011.

DUAN, Y. C.; MA, Y. C.; ZHANG, E.; SHI, X. J.; WANG, M. M.; YE, X. W.; LIU, H. M. Design and synthesis of novel 1,2,3-triazole-dithiocarbamate hybrids as potential anticancer agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 62, p. 11-9, 2013.

DUCHOWICZ, P. R.; TALEVI, A.; BELLERA, C.; BRUNO-BLANCH, L. E.; CASTRO, E. A. Application of descriptors based on Lipinski's rules in the QSPR study of aqueous solubilities. *Bioorg. Med. Chem.* v. 15, p. 3711-3719, 2007.

ELOKELY, K. M.; DOERKSEN, R. J. Docking challenge: Protein sampling and molecular docking performance. *Journal of chemical information and modeling*, v. 53, n. 8, p. 1934-1945, 2013.

FAROOQ, U.; MAHAJAN, R. C. Drug resistance in malaria. *J Vector Borne Dis*, v. 41, n. 3-4, p. 45-53, 2004.

FERRARONI, J. J.; HAYES, J. Drug-resistant falciparum malaria among the Mayongong Indians in the Brazilian Amazon. *Am J Trop Med Hyg.*, v. 28, n. 5, p. 909-11, 1979.

FERREIRA, M. E. S.; GOMES, M. S. M.; VIEIRA, J. L. F. Metemoglobinemia em pacientes com malária por *Plasmodium vivax* em uso oral de primaquina. *Ver Soc Bras Med Trop*, v. 44, n. 1, p. 113-5, 2011.

FOOTE, S. J.; GALATIS, D.; COWMAN, A. F. Amino acids in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene of *Plasmodium falciparum* involved in cycloguanil resistance differ from those involved in pyrimethamine resistance. *PNAS*, v. 87, n. 8, p. 3014-7, 1990.

FRANÇA, T. C. C.; SANTOS, M. G.; FIGUEROA-VILLAR, J. D. Malária: aspectos históricos e quimioterapia. *Quím Nova*, v. 31, n. 5, p. 1271-8, 2008.

GARCIA, L. S. Malária. *Clinics in Laboratory Medicine*, v. 30, p. 93-129, 2010.

GARAVITO, G.; ARTEAGA, L.; ACEBEY, L. La biocristalización del heme como una potencial diana farmacológica en el desarrollo de fármacos para el tratamiento de la malária. *Rev. Col. Cien Quím. Farm*, v. 31, p. 85-95, 2002.

GLANZNER, A. L.; SILVA, D. M. A Formação de Sais no Desenvolvimento de Fármacos. Encarte da Revista Átomo, n. 8, p. 1-16, 2010.

GO, M. L.; LI, Q. T. Interaction of the Antimalarial Agents Halofantrine and Lumefantrine with Lipid Bilayers. *Chem. Pharm. Bull.*, v. 51, n. 3, p. 241-6, 2003.

GUEIRARD, P.; TAVARES, J.; THIBERGE, S.; BERNEX, F.; ISHINO, T.; MILON, G.; FRANKE-FAYARD, B.; JANSE, C. J.; MÉNARD, R.; AMINO, R. Development of the malaria parasite in the skin of the mammalian host. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 107, n. 43, p. 18640-5, 2010.

GRANCHI, C.; BERTINI, S.; MACCHIA, M.; MINUTOLO, F. Inhibitors of lactate dehydrogenase isoforms and their therapeutic potentials. *Curr Med Chem*, v. 17, n. 7, p. 672-97, 2010.

GREENWOOD, B. M.; FIDOCK, D. A.; KYLE, D. E.; KAPPE, S. H. I.; ALONSO, P. L.; COLLINS, F. H.; DUFFY, P. E. Malaria: progress, perils, and prospects for eradication. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 118, n. 4, p. 1266-76, 2008.

GREGSON, A.; PLOWE, C. V. Mechanisms of resistance of malaria parasites to antifolates. *Pharmacol Rev*, v. 57, n. 1, p. 117-45, 2005.

GIFFIN, M. J.; HEASLET, H.; BRIK, A.; LIN, Y. C.; CAUVI, G.; WONG, C.-H.; MCREE, D. E.; ELDER, J. H.; STOUT, C. D.; TORBETT, B. E. A copper(I)-catalyzed 1,2,3-triazole azide-alkyne click compound, is a potent inhibitor of a multidrug-resistant HIV-1 protease variant. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 51, n. 20, p. 6263-70, 2008.

GRIFFING, S. M.; TAUIL, P. L.; UDHAYAKUMAR, V.; SILVA-FLANNERY, L. A historical perspective on malaria control in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 110, n. 6, p. 701-18, 2015.

HAMANN, A. R.; DE KOCK, C.; SMITH, P. J.; VAN OTTERLO, W. A.; BLACKIE, M. A. Synthesis of novel triazole-linked mefloquine derivatives: biological evaluation against *Plasmodium falciparum*. *Bioorg Med Chem Lett*, v. 24, n. 23, p. 5466-9, 2014.

HARVEY, K. L.; GILSON, P.R.; CRABB, B. S. A model for the progression of receptor-ligand interactions during erythrocyte invasion by *Plasmodium falciparum*. *Int J Parasitol*, v. 42, n. 6, p. 567-73, 2012.

HOU, T.; WANG, J.; ZHANG, W.; XU, X. - ADME Evaluation in Drug Discovery. 7. Prediction of Oral Absorption by Correlation and Classification. *J. Chem. Inf. Model.*, v. 47, p. 208-218, 2007.

HU, M.; KONOKI, K.; TACHIBANA, K. Cholesterol-independent membrane disruption caused by triterpenoid saponins. *Biochimica Et Biophysica Acta-Lipids and Lipid Metabolism*, v. 1299, p. 252-8, 1996.

ILIN, A.; NERSESYAN, A. Toxicology of iodine: A mini review. Arch Oncol, v. 21, p. 65-71, 2013.

KANTELE, A.; JOKIRANTA, T. S. Review of Cases With the Emerging Fifth Human Malaria Parasite, *Plasmodium knowlesi*. Clin Infect Dis, v. 52, n. 11, p. 1356-62, 2011.

KEITH, C.T.; BORISY, A.A.; STOCKWELL, B.R. Multicomponent therapeutics for networked systems. Nature Reviews Drug Discovery, v. 4, p. 71-8, 2005.

KITCHEN, L. W.; VAUGHN, D. W.; SKILLMAN, D. R. Role of US Military Research Programs in the Development of US Food and Drug Administration–Approved Antimalarial Drugs. Clin Infect Dis, v. 43, n. 1, p. 67-71, 2006.

KOUZNETSOV, V. V. e GÓMEZ-BARRIO, A. Recent developments in the design and synthesis of hybrid molecules based on aminoquinoline ring and their antiplasmodial evaluation. European Journal of Medicinal Chemistry, v. 44, p. 3091-113, 2009.

KOUZNETSOV, V. V.; TORRES, D. F. A. Antimaláricos: construcción de híbridos moleculares de la cloroquina. Universitas Scientiarum, v. 13, n. 3, p. 306-20, 2013.

KRETTLI, A. U.; ADEBAYO, J. O.; KRETTLI, L. G. Testing of Natural Products and Synthetic Molecules Aiming at New Antimalarials. Current Drug Targets, v. 10, p. 261-270, 2009.

KRETTLI, A. U.; ANDRADE-NETO, V. F.; BRANDAO, M. G. L.; FERRARI, W. M. S. The search for new antimalarial drugs from plants used to treat fever and malaria or plants randomly selected: a review. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v. 96, n. 8, p. 1033-42, 2001.

KRISHNA, S.; UHLEMANN, A. C.; HAYNES, R. K. 2004. Artemisinins: mechanisms of action and potential for resistance. Drug Resist Updat, v. 7, n. 4-5, p. 233-44, 2001.

LACERDA-QUEIROZ, N.; TEIXEIRA, M. M.; TEIXEIRA, A. L. Imunopatogênese da malária cerebral. Revista Brasileira de Neurologia, v. 44, n. 1, p. 13-19, 2008.

LOPEZ, A. J. R.; BALLESTER, A. P.; BRINGUEZ, J. S.; MARRERO, D. E. Tratamiento antimalárico: una revisión actualizada. AMC, v. 14, n. 1, 2010.

MAC-DANIEL, L.; MÉNARD, R. Plasmodium and mononuclear phagocytes. Microb Pathog, v. 78, n. 43-51, 2015.

MAINES, J.; KHURANA, N. R.; ROMAN, K.; KNAUP, D.; AHMAD, M. Cytotoxic Effects of Activated Bromine on Human Fetal Osteoblasts In Vitro. Journal of Endodontics, v. 32, n. 9, p. 886 – 9, 2006.

MCCONVILLE, M.; FERNÁNDEZ, J.; ANGULO-BARTUREN, Í.; BAHAMONTES-ROSA, N.; BALLELL-PAGES, L.; CASTAÑEDA, P.; DE CÓZAR, C.; CRESPO, B.; GUIJARRO, L.; JIMÉNEZ-DÍAZ, M. B.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, M. S.; DE MERCADO, J.; SANTOS-VILLAREJO, Á.; SANZ, L. M.; FRIGERIO, M.; WASHBOURN, G.; WARD, S. A.; NIXON, G. L.; BIAGINI, G. A.; BERRY, N. G.; BLACKMAN, M. J.; CALDERÓN, F.; O'NEILL, P. M. Carbamoyl Triazoles, Known Serine Protease Inhibitors, Are a Potent New Class of Antimalarials. *J Med Chem*, v. 58, n. 16, p. 6448-55, 2015.

MEUNIER, B.; ROBERT, A. Heme as trigger and target for trioxane-containing antimalarial drugs. *Acc Chem Res*, v. 43, n. 11, p. 1444-51, 2010.

MILLER, L. H.; SU, X. Artemisinin: Discovery from the Chinese Herbal Garden. *Cell*, v. 146, n. 6, p. 855-8, 2011.

MILLER, L. H.; BARUCH, D. I.; MARSH, K.; DOUMBO, O. K. The pathogenic basis of malaria. *Nature*, v. 415, n. 6872, p. 673-9, 2002.

MORALES, M. M. Métodos alternativos à utilização de animais em pesquisa científica: mito ou realidade? *Cienc. Cult.*, v. 60, n. 2, p. 33-6, 2008.

MOSSMAN, N. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity. *Journal of Immunological Methods*, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MOTA, M. M.; HAFALLA, J. C.; RODRIGUEZ, A. Migration through host cells activates *Plasmodium* sporozoites for infection. *Nat Med*, n. 11, p. 1318-22, 2002.

MOTA, M. M.; PRADEL, G.; VANDERBERG, J. P.; HAFALLA, J. C.; FREVERT, U.; NUSSENZWEIG, R. S.; NUSSENZWEIG, V.; RODRÍGUEZ, A. Migration of *Plasmodium* sporozoites through cells before infection. *Science*, v. 291, n. 5501, p. 141-4, 2001.

MS-SVS. 2015. Boletim Epidemiológico - Malária: Monitoramento dos casos no Brasil em 2014.

MUKHERJEE, A.; RAJASEKARAN, C. In-vitro hemolytic activity of *Allium stracheyi* Baker. *Journal of Pharmacy Research*, v. 3, n. 5, p. 1160-2, 2010.

NÁJERA, J. A.; GONZÁLEZ-SILVA, M. E ALONSO, P. L. Some Lessons for the Future from the Global Malaria Eradication Programme (1955–1969). *PLoS Med*, v. 8, n. 1, p. e1000412, 2011.

NOEDL, H.; SE, Y.; SCHAECHER, K.; SMITH, B. L.; SOCHEAT, D.; FUKUDA, M. M. Evidence of artemisinin-resistant malaria in western Cambodia. *New England Journal of Medicine*, v. 359, n. 24, p. 2619-20, 2008.

NZILA, A. M.; MBERU, E. K.; SULO, J.; DAYO, H.; WINSTANLEY, P. A.; SIBLEY, C. H.; WATKINS, W. M. Towards an understanding of the mechanism of pyrimethamine-sulfadoxine resistance in *Plasmodium falciparum*: genotyping of dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase of Kenyan parasites. *Antimicrob Agents Chemother* 44 (4): 991-6.

NZILA, A. M.; OKOMBO, J.; BECKER, R. P.; CHILENGI, R.; LANG, T.; NIEHUES, T. 2010. Anticancer agents against malaria: Time to revisit? *Trends of Parasitology* 26 (3): 125-9.

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. 2010. Malaria in Brazil: an overview. *Malária Journal* 09: 115.

PATIL, V.; GUERRANT, W.; CHEN, P. C.; GRYDER, B.; BENICEWICZ, D. B.; KHAN, S. I.; TEKWANI, B. L.; OYELERE, A. K. Antimalarial and antileishmanial activities of histone deacetylase inhibitors with triazole-linked cap group. *Bioorg Med Chem*, v. 18, n. 1, p. 415-25, 2010.

PATPI, S. R.; PULIPATI, L.; YOGESHWARI, P.; SRIRAM, D.; JAIN, N.; SRIDHAR, B.; MURTHY, R.; DEVI, T. A.; KALIVENDI, S. V.; KANTEVARI, S. 2012. Design, synthesis, and structure-activity correlations of novel dibenzo[b,d]furan, dibenzo[b,d]thiophene, and N-methylcarbazole clubbed 1,2,3-triazoles as potent inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Med Chem*, v. 55, n. 8, p. 3911-22, 2000.

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, p. e21237, 2011.

PEREIRA, D. G. Importância do metabolismo no planejamento de fármacos. *Química Nova*, v. 30, n. 1, p. 171-7, 2007.

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

PETERS, W.; PORTUS, J. H.; ROBINSON, B. L. The chemotherapy of rodent malaria, XXII. The value of drug-resistant strains of *P. berghei* in screening for blood schizontocidal activity. *Annual Tropical Medicine Parasitology*, v. 69, n. 2, p. 155-171, 1975.

PIETERS, R.; HUISMANS, D. R.; LEYVA, A.; VEERMAN, A. J. P. Adaptation of the rapid automated tetrazolium dye based (MTT) assay for chemosensitivity testing in childhood leukemia. *Cancer Letters*, v. 41, p. 323-32, 1988.

PINHEIRO, P. N. Q.; PENICHE, J. S. R.; SCHALCHE, T. R.; SCHALCHE, M. E. S.; CAMPOS, A. R. F. Aspectos farmacológicos do antimalárico Lumefantrina. *Rev Para Med*, v. 27, n. 1, 2013.

PIZARRO, J. C.; CHITARRA, V.; VERGER, D.; HOLM, I.; PETRES, S.; DARTEVELLE, S.; NATO, F.; LONGACRE, S.; BENTLEY, G.A. Crystal structure of a Fab complex formed with PfMSP1-19, the C-terminal fragment of merozoite surface protein 1 from *Plasmodium falciparum*: a malaria vaccine candidate. *Journal of Molecular Biology*, v. 328, p. 1091-103, 2003.

PRADEL, G. e FREVERT, U. Malaria Sporozoites Actively Enter and Pass Through Rat Kupffer Cells Prior to Hepatocyte Invasion. *Hepatology*, v. 33, n. 5, 1154-65, 2001.

PRUDÊNCIO, M.; RODRIGUEZ, A.; MOTA, M. The silent path to thousands of merozoites: the *Plasmodium* liver stage. *Nature*, v. 4, n. 11, p. 849-56, 2006.

RAY, S.; MADRID, P. B; CATZ, P.; LEVALLEY, S. E.; FURNISS, M. J.; RAUSCH, L. L.; GUY, R. K.; DERISI, J. L.; IYER, L. V.; GREEN, C. E.; MIRSALIS, J. C. Development of a New Generation of 4-Aminoquinoline Antimalarial Compounds Using Predictive Pharmacokinetic and Toxicology Models. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 53, n. 9, p. 3685-95, 2010.

READ, J. A.; WINTER, V. J.; ESZES, C. M.; SESSIONS, R. B.; BRADY, R. L. Structural basis for altered activity of M- and H-isozyme forms of human lactate dehydrogenase. *Proteins*, v. 43, n. 2, p.175-85, 2001.

RENNENBERG, A.; LEHMANN, C.; HEITMANN, A.; WITT, T.; HANSEN, G.; NAGARAJAN, K.; DESCHERMEIER, C.; TURK, V.; HILGENFELD, R.; HEUSSLER, V. T. Exoerythrocytic Plasmodium parasites secrete a cysteine protease inhibitor involved in sporozoite invasion and capable of blocking cell death of host hepatocytes. *PLoS Pathog*, v. 6, n. 3, p. e1000825, 2010.

RIDLEY, R. G. Medical need, scientific opportunity and the drive for antimalarial drugs. *Nature*, v. 415, n. 6872, p. 686-93, 2002.

RIECKMANN, K. H.; DAVIS, D. R.; HUTTON, D. C. Plasmodium vivax resistance to chloroquine? *Lancet*, v. 2, p. 1183-4, 1989.

ROGERO, S. O.; LUGÃO, A. B.; IKEDA, T. I.; CRUZ, Á. S. Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. *Materials Research*, v. 6, n. 3, p. 317-20, 2003.

SANTOS, J. O.; PEREIRA, G. R.; BRANDÃO, G. C.; BORGATI, T. F.; ARANTES, L. M.; PAULA, R. C.; SOARES, L. F.; NASCIMENTO, M. F. A.; FERREIRA, M. R. C.; TARANTO, AL. G.; VAROTTI, F. P.; OLIVEIRA, A. B. Synthesis, in vitro Antimalarial Activity and in silico Studies of Hybrid Kauranoid 1,2,3-Triazoles Derived from

Naturally Occurring Diterpenes. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 27, n. 3, p. 551-65, 2016.

SERAJUDDIN, A. T. Salt formation to improve drug solubility. *Adv Drug Deliv Ver*, v. 59, n. 7, p. 603-16, 2007.

SHANKS, G. D. 1993 Sir Henry Wellcome Medal and Prize recipient. The rise and fall of mefloquine as an antimalarial drug in South East Asia. *Mil Med*, v. 159, n. 4, p. 275-81, 1994.

SILVA, L. H. P.; OLIVEIRA, V. E. G. O desafio da malária: o caso brasileiro e o que se pode esperar dos progressos da era genômica. *Ciênc. saúde coletiva*, v. 7, n. 1, p. 49-63, 2002.

SILVA, R. da; PAIVA, C. H. A. O governo JK e o Grupo de Trabalho de Controle e Erradicação da Malária no Brasil: encontros e desencontros nas agendas brasileira e internacional de saúde, 1958-1961. *Hist. Cienc. Saúde-Manguinhos*, v. 22, n. 1, p. 95-114, 2015.

SILVA, T. H. A.; OLIVEIRA, M. T.; SANTOS, H. F.; OLIVEIRA, A. B.; DE ALMEIDA, W. B. Estudo de modelagem molecular de complexos ferriprotoporfirina-IX e quinolinocarbinolaminas antimaláricas: proposta de um farmacóforo. *Química Nova*, v. 28, n. 2, p. 244-9, 2005.

SIMONE, R.; CHINI, M. G.; BRUNO, I.; RICCIO, R.; MUELLER, D.; WERZ, O.; BIFULCO, G. Structure-based discovery of inhibitors of microsomal prostaglandin E2 synthase-1, 5-lipoxygenase and 5-lipoxygenase-activating protein: promising hits for the development of new anti-inflammatory agents. *J Med Chem*, v. 54, n. 6, 1565-75, 2011.

SINGH, P.; SACHDEVA, S.; RAJ, R.; KUMAR, V.; MAHAJAN, M. P.; NASSER, S.; VIVAS, L.; GUT, J.; ROSENTHAL, P. J.; FENG, T. S.; CHIBALE, K. Antiplasmodial and cytotoxicity evaluation of 3-functionalized 2-azetidinone derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 21, n. 15, p. 4561-3, 2011.

SOARES, R. R.; CORRALES, R. C. N. R, LOPES, F. V.; ALVES, M. J. M.; DA SILVA, A. D.; ABRAMO, C. Synthesis and in vivo antimalarial activity of novel derivatives of 6-mercaptapurine. *Letters in Drug Design & Discovery*, v. 10, p. 741-7, 2013.

SUBRAMANIAN, N.; RAY, S.; GHOSAL, S. K.; BHADRA, R.; MOULIK, S. P. Formulation design of self-microemulsifying drug delivery systems for improved oral bioavailability of celecoxib. *Biol Pharm Bull*, v. 27, p.1993–9, 2004.

SUWANARUSK, R.; RUSSELL, B.; CHAVCHICH, M.; CHALFEIN, F.; KENANGALEM, E.; KOSASAVEE, V.; PRASETYORINI, B.; PIERA, K. A.; BAREND, M.; BROCKMAN, A.; LEK-UTHAI, U.; ANSTEY, N. M.; TJITRA, E.; NOSTEN, F.; CHENG, Q.; PRICE, R. N. Chloroquine Resistant Plasmodium vivax: In

Vitro Characterisation and Association with Molecular Polymorphisms. PLoS ONE, v. 2, n. 10, p. e1089, 2007.

TEEYAPANT, R.; WOERDENBAG, H. J.; KREIS, P.; HACKER, J.; WRAY, V.; WITTE, L.; PROKSCH, P. Antibiotic and Cytotoxic Activity of Brominated Compounds from the Marine Sponge *Verongia aerophoba*. Z Naturforsch C, v. 48, n. 11-12, p.939-45, 1993.

TOOVEY, S. Mefloquine neurotoxicity: a literature review. Travel Med Infect Dis, v. 7, n. 1, p. 2-6, 2009.

TU, Y. The discovery of artemisinin (qinghaosu) and gifts from Chinese medicine. Nat Med, v. 17, n. 10, p. 1217-20, 2011.

TUN, K. M.; JEEYAPANT, A.; IMWONG, M.; THEIN, M.; AUNG, S. S. M.; HLAING, T. M.; YUENTRAKUL, P.; PROMNARATE, C.; DHORDA, M.; WOODROW, C. J.; DONDORP, A. M.; ASHLEY, E. A.; SMITHUIS, F. M.; WHITE, N. J.; DAY, N. P. J. Parasite clearance rates in Upper Myanmar indicate a distinctive artemisinin resistance phenotype: a therapeutic efficacy study. Malaria Journal, v. 15, n. 1, p. 185, 2016.

UDOMSANGPETCH, R.; KANEKO, O.; CHOTIVANICH, K.; SATTABONGKOT, J. Cultivation of *Plasmodium vivax*. Trends Parasitol, v. 24, n. 2, p. 85-8, 2008.

VALADARES, M. C. Avaliação de toxicidade aguda: estratégias após a “era do teste DL50”. Revista Eletrônica de Farmácia, v. 3, n. 2, p. 93-8, 2006.

VALE, N.; MOREIRA, R.; GOMES, P. Quimioterapia da Malária: um século no desenvolvimento de antimaláricos. Química, v. 99, p. 61-73, 2005.

VAROTTI, F. P.; BOTELHO, A. C. C.; ANDRADE, A. A.; DE PAULA, R. C.; FAGUNDES, E. M. S.; VALVERDE, A.; MAYER, L. M. U.; MENDONÇA, J. S.; DE SOUZA, M. V. N.; BOECHAT, N.; KRETTLI, A. U. Synthesis, Antimalarial Activity, and Intracellular Targets of MEFAS, a New Hybrid Compound Derived from Mefloquine and Artesunate. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 52, n. 11, p. 3868-74, 2008.

WANG, J.; HUANG, L.; LI, J.; FAN, Q.; LONG, Y.; LI, Y.; ZHOU, B. Artemisinin Directly Targets Malarial Mitochondria through Its Specific Mitochondrial Activation. PLoS ONE, v. 5, n. 3, p. e9582, 2010.

WANG, P.; BROOKS, D. R.; SIMS, P. F.; HYDE, J. E. A mutation-specific PCR system to detect sequence variation in the dihydropteroate synthetase gene of *Plasmodium falciparum*. Mol Biochem Parasitol, v. 71, n. 1, p. 115-25, 1995.

WANG, X. L.; WAN, K.; ZHOU, C. H. Synthesis of novel sulfanilamide-derived 1,2,3-triazoles and their evaluation for antibacterial and antifungal activities. Eur J Med Chem, v. 45, n. 10, p. 4631-9, 2010.

WATERBEEMD, H. V.; GIFFORD, E. ADMET in silico modelling: towards prediction paradise? *Nat Rev Drug Discov.* v. 2, n. 3, p. 192-204. 2003.

WELLEMS, T. E.; PLOWE, C. V. Chloroquine-resistant malaria. *Journal of Infection Disease*, v. 184, n. 6, p. 770-6, 2001.

WHITE, N. J. The role of anti-malarial drugs in eliminating malaria. *Malaria Journal*, v. 7, Supl. 1, p. S8, 2008.

WHITING, M.; TRIPP, J. C.; LIN, Y. C.; LINDSTROM, W.; OLSON, A. J.; ELDER, J. H.; SHARPLESS, K. B.; FOKIN, V. V. Rapid discovery and structure-activity profiling of novel inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 protease enabled by the copper(I)-catalyzed synthesis of 1,2,3-triazoles and their further functionalization. *J Med Chem*, v. 49, n. 26, p. 7697-710, 2006.

WHO. Chemotherapy of malaria. World Health Organization Technical Report Series, n. 375, 1967.

WHO. Chemotherapy of malaria and resistance to antimalarials. World Health Organization Technical Report Series, n. 529, 1973.

WHO. World Malaria Report 2014. 2014. Disponível em: [http://www.who.int/malaria/publications/world\\_malaria\\_report\\_2014/en/](http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2014/en/) Acesso em 11/01/2016

WHO. World Malaria Report 2015. 2015a. Disponível em: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/200018/1/9789241565158\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/200018/1/9789241565158_eng.pdf) Acesso em 11/01/2016

WHO. Relatório sobre o paludismo no mundo. Resumo 2014. 2015b.

WHO. World Malaria Report 2016. 2016. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/252038/1/9789241511711-eng.pdf>. Acesso em 11/01/2017.

WHO- ROLL BACK MALARIA. 2016. Malaria in Africa Disponível em: ([http://www.rollbackmalaria.org/microsites/wmd2014/rbminfosheet\\_3.html](http://www.rollbackmalaria.org/microsites/wmd2014/rbminfosheet_3.html)). Acesso em 20/01/2016.

WINTER, V. J.; CAMERON, A.; TRANTER, R.; SESSIONS, R. B.; BRADY, R. L. Crystal structure of Plasmodium berghei lactate dehydrogenase indicates the unique structural differences of these enzymes are shared across the Plasmodium genus. *Mol Biochem Parasitol*, v. 131, n. 1, p. 1-10, 2003.

WYKES, M. N. e HORNE-DEBETS, J. Dendritic cells: The Torjan horse of malaria? *International Journal for Parasitology*, v. 42, p. 583-7, 2012.

YUTHAVONG, Y. Basis for antifolate action and resistance in malaria. *Microbes and Infection*, v. 4, n. 2, p. 175-182, 2002.

ZHENG, H.; TAN, Z.; XU, W. Immune Evasion Strategies of Pre-Erythrocytic Malaria Parasites. *Mediators of Inflammation*, v. 2014, p. 1-6, 2014.

ZHENG, W.; JIANG, H.; XIONG, Z.; JIANG, Z.; CHEN, H. Efficacy of Pyrimethamine/Sulfadoxine versus Chloroquine for the Treatment of Uncomplicated Falciparum Malaria in Children Aged Under 5 Years. *Iranian Journal of Parasitology*, v. 8, n. 1, p. 1–17, 2013.